

Die Rolle von MIF (macrophage migration inhibitory factor) in der Sepsis-induzierten Immunparalyse

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der naturwissenschaftlichen Fakultät IV
Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Nils Pollak
aus Selb
2005**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von August 2001 bis Mai 2005 unter Anleitung von Frau Prof. Dr. D.N. Männel am Institut für Immunologie des Klinikums der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am:

25.05.2005

Die Arbeit wurde geleitet von

Prof. Dr. A. Buschauer

Prof. Dr. D.N. Männel

Prüfungsausschuß:

Prof. Dr. R. Seifert (Vorsitz)

Prof. Dr. A. Buschauer

Prof. Dr. D.N. Männel

Prof. Dr. J. Heilmann

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Makrophagen migrationsinhibierender Faktor (MIF)	1
1.1.1. Historischer Hintergrund	1
1.1.2. Struktur	2
1.1.3. MIF als Zytokin	5
1.1.4. MIF als endokriner Faktor	6
1.1.5. MIF als Enzym	8
1.1.6. Die Rolle von MIF bei Krankheiten	10
1.2. Sepsis und septischer Schock	14
1.3. Immunparalyse	18
1.4. Ziel der Arbeit	20
2. Material	21
2.1. Chemikalien und Reagenzien	21
2.2. Verbrauchsmaterial und Geräte	22
2.3. Kits	23
2.4. Molekulargewichtsstandards	24
2.5. Antikörper und Enzyme	24
2.6. Oligonukleotide	24
2.7. Puffer und Lösungen	25
2.8. Zelllinien	26
2.9. Zytokine	26
2.10. Tiere	27
2.11. Bakterien	27
2.12. Kultivierung der Bakterien	27
3. Methoden	28
3.1. Bestimmung der mRNA-Werte aus der Milz	28
3.1.1. Isolierung von total RNA aus der Milz	28
3.1.2. Reverse Transkription	28
3.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
3.1.4. Agarose-Gelelektrophorese	30
3.2. Proteinchemische Methoden	30
3.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
3.2.2. Coomassie-Färbung	31
3.2.3. Western Blot	31
3.3. Zellbiologische Methoden	32
3.3.1. Zellkulturbedingungen	32
3.3.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen	32
3.3.3. Bestimmung der Lebendzellzahl	33
3.3.4. Mycoplasmentest	33
3.3.5. Gewinnung und Kultur primärer Peritoneal- und Peritonealexsudatzellen (PEC)	33
3.4. Biochemische Methoden	34
3.5. Immunologische Methoden	34
3.5.1. Allgemeines über ELISA	34
3.5.2. ELISA zur Quantifizierung von mTNF, mIL-6, mMIF und huMIF	35

3.5.3. Allgemeines zum Radioimmunoassay (RIA)	35
3.5.4. RIA zur Quantifizierung von Corticosteron	36
3.6. Bioaktivitätstests	36
3.6.1. TNF-Zytotoxizitäts-Assay	36
3.6.2. Dopachrom-Tautomerase-Assay	36
3.7. Tierexperimentelle Methoden	37
3.7.1. Haltung der Tiere	37
3.7.2. Induktion einer experimentellen septischen Peritonitis mittels zökaler Ligation und Punktion (CLP)	37
3.7.3. Induktion einer Primär- und Sekundärinfektion	38
3.7.4. Stimulierung zur Bestimmung der Produktionsfähigkeit von Zytokinen	38
3.7.5. Serumgewinnung aus Mausblut	39
3.8. Mikrobiologische Methoden	39
3.8.1. Kultivierung und Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) von <i>Salmonella typhimurium</i>	39
3.8.2. Kultivierung und Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
3.8.3. Kultivierung und Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) von <i>Listeria monocytogenes</i>	40
3.9. Design der Sepsisstudie	40
3.10. Statistik	41
 4. Ergebnisse	 43
4.1. Überprüfung der Reinheit und der biologischen Aktivität des rekombinanten humanen MIF (rhMIF)	43
4.1.1. Reinheit und Molekulargewicht des rhMIF	43
4.1.2. Bioaktivität des rhMIF	44
4.2. Etablierung von Infektionsmodellen	45
4.3. Die Rolle von MIF bei gesunden Mäusen	46
4.3.1. Einfluss von MIF auf Entzündungsparameter	46
4.3.2. Einfluss der Neutralisation von MIF auf TNF-Serumspiegel	47
4.3.3. Neutralisation von MIF vor einer subletalen Infektion	48
4.3.4. Applikation von MIF vor einer subletalen <i>S. tm.</i> -Infektion	49
4.4. Untersuchung des Immunstatus nach CLP	49
4.4.1. Kinetik von Immunmodulatoren nach CLP	50
4.4.2. Kinetik der Produktionsfähigkeit von Immunmodulatoren nach CLP	51
4.5. Kennzeichen der Immunparalyse	53
4.6. Die Rolle von MIF in der Immunparalyse	55
4.6.1. Neutralisation von MIF in der Immunparalyse	56
4.6.2. Gabe von exogenem MIF in der Immunparalyse	57
4.6.3. Bestimmung des besten Zeitpunkts und der optimalen Dosis für die Gabe von MIF im Superinfektionsmodell	59
4.6.4. Induktion proinflammatorische Zytokine in immunparalysierten Mäusen durch exogenes MIF	62
4.7. Der Einfluss der Neutralisation von MIF zu Beginn der Sepsis auf die Entstehung der Immunparalyse	66
4.7.1. Neutralisation von MIF zu Beginn der Sepsis erhöht die Überlebenschancen im Superinfektionsmodell	66
4.7.2. Neutralisation von MIF zu Beginn der Sepsis und die Auswirkungen auf die proinflammatorischen Zytokinspiegel	67
4.8. Einfluss der Glucocorticoide auf die Immunparalyse	69
4.8.1. Bestimmung eines geeigneten Lösungsmittels für Mifepriston in in vivo Experimenten	70

4.8.2. Die unmittelbaren Auswirkungen der Inhibition der Glucocorticoide gleichzeitig zur CLP	71
4.8.3. Die Auswirkungen der Inhibition der Glucocorticoidwirkung gleichzeitig zur CLP auf die Immunparalyse	73
4.8.4. Die Auswirkungen der Inhibition der Glucocorticoidwirkung zum Zeitpunkt der Immunparalyse	75
4.9. Einfluss der MIF-Spiegel auf den Krankheitsverlauf der humanen Sepsis	76
4.9.1. Verlauf der MIF-Plasmaspiegel während der Sepsis	77
4.9.2. Korrelation zwischen MIF-Plasmaspiegel und Überleben der Sepsis	78
5. Diskussion	80
5.1. Die Rolle von MIF bei gesunden Mäusen	80
5.2. Die Auswirkungen der CLP auf das Immunsystem	82
5.3. Die Auswirkungen der Immunparalyse auf den Organismus	84
5.4. Die Rolle von MIF in der Immunparalyse	85
5.5. Die Auswirkungen der Neutralisation von MIF zu Beginn der Sepsis auf die Entstehung der Immunparalyse	87
5.6. Die Rolle der Glucocorticoide in der Immunparalyse	88
5.7. Die Rolle der MIF-Spiegel während des Krankheitsverlaufs der humanen Sepsis	91
6. Zusammenfassung	93
7. Literaturverzeichnis	95
8. Abkürzungen	105
9. Publikationen	107
10. Danksagung	108

1. Einleitung

1.1. Makrophagen migrationsinhibierender Faktor (MIF)

1.1.1. Historischer Hintergrund

1932 wurden zum ersten Mal Hinweise entdeckt, dass es migrationsinhibierende Faktoren gibt. In diesem Jahr fanden Rich und Lewis heraus, dass die Migration von Leukozyten und Makrophagen in Kulturen Tuberkulin-behandelter Gewebe durch Antigene inhibiert wird. Daraus schlussfolgerten sie, dass Lymphozyten durch Antigene zur Produktion von migrationsinhibierenden Faktoren stimuliert werden (Rich, 1932). Mit der Weiterentwicklung der Migrationsmessung von mononukleären Zellen in Kapillarröhrchen (George, 1962) wurde der Grundstein für die Entdeckung von MIF als eigenständigem Faktor gelegt. Dies geschah im Jahr 1966 durch die Arbeiten von David et al. und Bloom und Bennett (Bloom, 1966, David, 1966). Darin konnte gezeigt werden, dass zelluläre Immunreaktionen wie die Spätyp-Hypersensitivität (Delayed-type hypersensitivity, DTH) durch einen löslichen, von aktivierten T-Zellen gebildeten Faktor verursacht werden. So erhielt MIF seinen historischen Namen.

Da MIF der erste lösliche nicht-immunglobuline Faktor war, der in vivo nachgewiesen werden konnte, rückte MIF in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Doch obwohl etliche Anstrengungen zur Untersuchung von MIF unternommen wurden, wurde über 25 Jahre relativ wenig publiziert. In dieser Phase wurden vor allem weitere Wirkmechanismen neben der Migrationshemmung von MIF auf Makrophagen gefunden. So konnte gezeigt werden, dass MIF die Oberflächenadhäsion und die Phagozytoserate von Makrophagen erhöht (Nathan, 1971, Nathan, 1973).

Das Hauptproblem bei der Erforschung von MIF war, dass keine ausreichenden Quellen für MIF gefunden wurden, um die Primärsequenz zu entschlüsseln und damit das reine Protein klonieren zu können. Stattdessen wurden Kulturüberstände von Leukozytenkulturen verwendet, die verunreinigt waren und MIF in geringen Mengen enthielten. Die Verunreinigungen führten zu falschen Ergebnissen und zum Rückzug mancher Publikation (David, 1993). Deswegen und durch die Entdeckung, dass andere Mediatoren wie Interferon- γ (IFN- γ) (Thurman, 1985) und Interleukin-4 (IL-4) (McInnes, 1988) ebenfalls migrationsinhibierend wirken, ging das Interesse an MIF zurück. Erst mit

der erfolgreichen Klonierung humaner MIF-cDNA (Weiser, 1989) rückte MIF wieder stärker in den Fokus der Wissenschaft. Der endgültige Durchbruch gelang mit der rekombinanten Herstellung des Proteins (Bernhagen, 1993). Dadurch war es möglich, MIF in großen Mengen rein herzustellen, um damit die biologischen Funktionen zu testen. Heute sind viele biologische Funktionen von MIF bekannt, die weit über die Hemmung der Migration von Makrophagen hinausgehen. Der historische Name blieb aber bestehen.

1.1.2. Struktur

Die monomere Form von humanem MIF besteht aus 114 Aminosäuren. Diese bilden in der Sekundärstruktur zwei antiparallele α -Helices und sechs β -Stränge, von denen vier ein β -Faltblatt ergeben, aus (Sun, 1996). Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse ergab einen Homotrimer (Sun, 1996, Suzuki, 1996a). Der Trimer ist so gefaltet, dass drei β -Faltblätter von sechs α -Helices umgeben sind und einen Tunnel bilden, der sich durch die gesamte Länge des Moleküls zieht. Das Innere des Tunnels ist durch ein positives elektrostatisches Potential charakterisiert, welches eine mögliche Interaktion mit negativen Reaktionspartnern darstellt. Die dreidimensionale Struktur wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Monomeren und durch einen hydrophoben Kern stabilisiert.

Die Struktur von MIF gleicht keinem anderen bekannten Zytokin, weist aber eine hohe Ähnlichkeit zu den bakteriellen Enzymen Chorismatmutase, 4-Oxalocrotonatautomerase (4-OT) und 5-Carboxy-methyl-2-hydroxymuconatisomerase (CHMI) auf (Chook, 1994, Subramanya, 1996). Alle diese Enzyme sind entweder Homotrimere, oder, wie bei 4-OT, ein Trimer aus Homodimeren, und besitzen den gleichen Aufbau wie MIF. Bei zwei von ihnen, 4-OT und CHMI, liegt, wie bei MIF, N-terminal die katalytische Base Prolin vor (Swope, 1998). Trotz der großen Ähnlichkeit auf struktureller Ebene finden sich keine Sequenzhomologien zwischen MIF und den bakteriellen Enzymen.

Die Aminosäuresequenz von MIF ist sehr homolog in verschiedenen Spezies. Bei Säugetieren stimmt sie bis zu 90% überein (Calandra, 2003). Dennoch gibt es genetische Unterschiede zwischen humanem und murinem MIF, die über 90% Homologie in der Primärsequenz besitzen (Bernhagen, 1994). Während beim Menschen MIF auf einem einzigen funktionellen Gen, das aus drei Exons und zwei Introns aufgebaut ist, exprimiert wird, liegen bei der Maus mehr als 10 Pseudogene vor (Bozza, 1995, Kozak, 1995, Mitchell, 1995, Paralkar, 1994). Auf der Ebene der codierenden genomischen DNA

besitzen beide wieder ein hohes Maß an Homogenität. Ein einzelnes mRNA-Transkript mit einer Länge von 0,6 kb ist sowohl für murines, als auch für humanes MIF kennzeichnend (Bernhagen, 1998).

MIF hat ein Molekulargewicht von 12,5 kDa und wird posttranslationell nicht glykosyliert. Deswegen ist MIF auch unter dem Namen Glycosylation Inhibiting Factor (GIF) bekannt (Bernhagen, 1994, Zeng, 1993). MIF liegt in Vesikeln im Inneren der Zelle vor. Es ist allerdings unklar, wie MIF dorthin und aus der Zelle heraus gelangt, da MIF keine Signalsequenz besitzt, die den Export in das endoplasmatische Retikulum leiten könnte (Bernhagen, 1994, Weiser, 1989). Auch der exakte Oligomerisierungsgrad von MIF ist bis jetzt nicht genau geklärt. Bekannt ist, dass MIF von Menschen (Kato, 1996, Sugimoto, 1996, Sun, 1996) und Ratten (Suzuki, 1996b) in der Röntgenstrukturanalyse einen Trimer bildet. Dagegen wurde mit anderen Methoden, wie NMR (Muhlhahn, 1996) und Gelfiltration (Zeng, 1993) ein Dimer für humanes MIF postuliert. Neuere Untersuchungen des Sedimentationsverhaltens von MIF legen den Aufbau von MIF als Trimer nahe (Philo, 2004). Bis heute ließ es sich nicht genau klären, in welchem Oligomerisierungszustand MIF in vivo vorliegt.

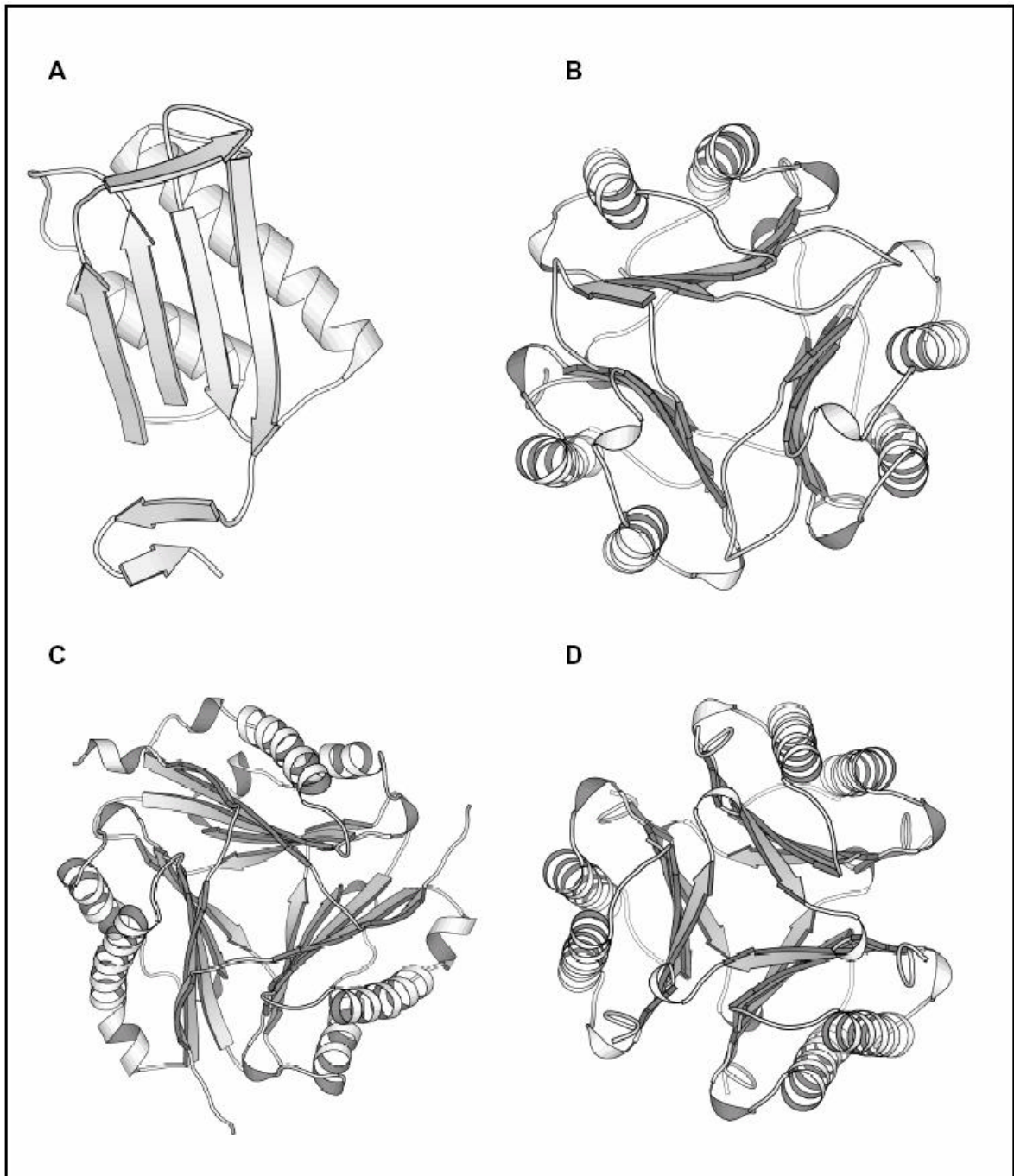


Abbildung 1:
Dreidimensionale Strukturen von MIF und seinen Homologen in verschiedenen Oligomerisierungszuständen. A MIF Monomer B MIF Trimer C 5-Carboxymethyl-2-hydroxymuconatisomerase (CHMI) Trimer D 4-Oxalocrotonatautomerase (4-OT) Hexamer. (Mischke, 2000)

1.1.3. MIF als Zytokin

MIF, das als eines der ersten Zytokine 1966 entdeckt wurde, galt lange Zeit als ein T-Zell-spezifisches Zytokin, das die Migration von Makrophagen hemmt (Bloom, 1966, David, 1966). Heute kennt man eine Vielzahl von Bildungsarten und Wirkmechanismen für MIF. Trotz der neuen Erkenntnisse ist es schwierig, MIF zu klassifizieren, da MIF neben den vielen Merkmalen von Zytokinen auch typische Eigenschaften von Hormonen oder Enzymen besitzt. Dennoch wird MIF in den meisten Publikationen als Zytokin beschrieben. Für die Zuordnung zu den Zytokinen sprechen die vielen proinflammatorischen Eigenschaften von MIF. Die Bedeutung von MIF als Entzündungsmediator wird bei der Neutralisation von MIF im Mausmodell der septischen Peritonitis deutlich. In diesem Versuch konnten die Tiere vor den Folgen eines letalen septischen Schocks durch die Behandlung mit anti-MIF-Antikörpern geschützt werden (Calandra, 2000).

MIF liegt vorgeformt in intrazellulären Vesikeln vor und wird auf einen Stimulus hin ausgeschüttet. Außerdem zirkuliert MIF im Blutstrom von Menschen und Nagetieren mit einer Konzentration von 3 – 5 ng/ml (Metz, 1997). Diese beiden Merkmale unterscheiden MIF von anderen proinflammatorischen Zytokinen, die auf einen Reiz hin erst synthetisiert werden müssen und nicht konstitutiv vorliegen (Baugh, 2002). Die zellulären Quellen von MIF sind sehr unterschiedlich und im ganzen Körper weit verbreitet. Sie reichen von Zellen des Immunsystems über Hypophysenzellen bis hin zu Endothelzellen (Calandra, 2003). Eine der wichtigsten Quellen für MIF sind die Makrophagen, die ursprünglich nur als Zielzellen der Wirkung von MIF galten. MIF wird aus ihnen nach Stimulierung durch bakterielle Endotoxine und Exotoxine, wie Lipopolysaccharid (LPS), Toxic shock syndrome toxine-1 (TSST-1) und Streptococcal pyrogenic exotoxin A (SPEA), aber auch durch proinflammatorische Effektormoleküle, wie Tumornekrosefaktor (TNF) und Interferon- γ (IFN- γ), ausgeschüttet (Calandra, 1994, Calandra, 1998). Die Menge an sezerniertem MIF als Antwort auf die Stimulierung entspricht einer glockenförmigen dosisabhängigen Kurve. Nach seiner Freisetzung wirkt MIF wie ein klassisches proinflammatorisches Zytokin, indem es Zellen des Immunsystems aktiviert. Dies zeigt sich anhand einer steigenden Zellproliferationsrate von Lymphozyten und einer erhöhten Phagozytoserate von Makrophagen (Bacher, 1996, Nathan, 1971). Außerdem wird durch MIF die Apoptose von Makrophagen und Neutrophilen gehemmt (Baumann, 2003, Mitchell, 2002). Alle diese Eigenschaften tragen zu einer verbesserten Immunantwort bei. Am Anfang einer akuten Entzündung sind erhöhte Gewebe- und Serumspiegel von MIF schädlich. Dies zeigte sich in Tierversuchen, in denen die Kombination aus einer nicht

letalen Peritonitis mit hohen Dosen von MIF zu einer erhöhten Mortalität der Tiere führte (Calandra, 2000). Die Injektion hoher Dosen von MIF allein führt nicht zum Tod der Mäuse, im Gegensatz zu TNF, das in hohen Dosen letal ist (Kettelhut, 1987). Die proinflammatorische Wirkung von MIF während der akuten Entzündung wird durch die Stimulierung und Ausschüttung vieler entzündungsfördernder Faktoren, wie TNF, IL-6, Stickoxid (NO), und Produkten des Arachidonsäuremetabolismus deutlich (Bernhagen, 1994, Calandra, 1995, Mitchell, 1999). Weiterhin ist MIF auch ein natürlicher Gegenspieler der antiinflammatorischen Glucocorticoide, indem MIF die durch Glucocorticoide induzierte Inhibition der proinflammatorischen Stoffe TNF, IL-1, IL-6, IL-8 rückgängig macht (Calandra, 1995).

MIF zeigt viele Eigenschaften, die für seine Einteilung als Zytokin sprechen, aber auch manche, die untypisch sind. Eines der wichtigsten Merkmale für ein Zytokin ist ein spezifischer Rezeptor auf der Oberfläche einer Zielzelle. Durch die Bindung an den Rezeptor kommt es zur Aktivierung der Signaltransduktion (und evtl. Gentranskription) und damit zu einem Effekt in der Zelle. Trotz intensiver Bemühungen konnte jahrelang kein Rezeptor für MIF gefunden werden. Erst 2003 wurde mit CD 74, der invarianten Kette des MHC Klasse II, ein möglicher Rezeptor gefunden (Leng, 2003). CD 74 reguliert in der Zelle den Transport von Klasse-II-Proteinen vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Komplex (Cresswell, 1994). Trotzdem werden 2 – 5 % des gesamten CD 74-Gehalts auf der Zelloberfläche exprimiert (Sant, 1985, Wraight, 1990). Ob CD 74 wirklich als Rezeptor oder nur als Bindungspartner dient, ohne einen Effekt in der Zelle auszulösen, muss noch geklärt werden.

1.1.4. MIF als endokriner Faktor

Bei der Suche nach einem systemischen Gegenregulator für die starken Effekte von Glucocorticoiden stieß man 1993 auf MIF. Dabei wurde entdeckt, dass MIF von einer corticotropen Hypophysenzelllinie sezerniert wird (Bernhagen, 1993). Ein Jahr später konnte gezeigt werden, dass MIF nach der Stimulierung mit LPS aus der Hypophyse sezerniert wird, um mit seinen proinflammatorischen Eigenschaften zur Immunabwehr beizutragen (Bernhagen, 1994).

Weitere Studien zeigten, dass MIF auf allen Ebenen der HPA-Achse (Hypothalamus, pituitary gland and adrenal gland) produziert wird. MIF-Protein und -mRNA wurden in den Neuronen des Hypothalamus gefunden (Bacher, 1998). In Hypophysenzellen ist MIF in

sekretorischen Vesikeln lokalisiert, die auch adrenocorticotropes Hormon (ACTH) und Thyrotropin (TSH) enthalten (Nishino, 1995). Immunzytochemische und ELISA-Daten (enzyme-linked immunosorbent assay) haben gezeigt, dass MIF 0,5 % des totalen Hypophysen-Proteininhalts ausmacht (Bernhagen, 1993). Dieser Anteil gleicht dem anderer Hypophysenhormone, wie ACTH und Prolactin. CRF (corticotropin-releasing factor) induziert die Expression und Freisetzung von MIF aus den Hypophysenzellen (Waeber, 1998). Weiterhin wurde MIF-mRNA und -Protein auch in der Nebenniere von Nagetieren gefunden (Bacher, 1997).

Die systemische Konzentration von MIF unterliegt, wie die von Cortisol, einem zirkadianen Rhythmus (Petrovsky, 2003). Dagegen erfolgt die Freisetzung von MIF aus den Zellen der HPA-Achse nach systemischer Injektion von LPS schnell. Dies zeigt sich durch einen raschen Anstieg der MIF-Plasmaspiegel und einem Abnehmen des HPA-Gewebeinhalts (Bernhagen, 1993). Etwas zeitverzögert beginnt die de-novo-Synthese von MIF in den Zellen der HPA-Achse, die durch erhöhte mRNA-Werte charakterisiert ist. Dieses Antwortschema auf die Gabe von LPS, mit einem Abnehmen des Gehalts an MIF im Gewebe und anschließender Neusynthese von MIF, kann in vielen MIF enthaltenden Geweben nachgewiesen werden (Bacher, 1997). Ähnlich sieht die Freisetzung von MIF nach Behandlung mit Glucocorticoiden aus. In einem in vitro Experiment wurde gezeigt, dass Makrophagen durch Cortisol oder Dexamethason zur Produktion und Freisetzung von MIF stimuliert wurden (Bacher, 1996, Calandra, 1995). Die Dosis-Wirkungs-Kurve der Produktion von MIF aus Makrophagen nach Stimulierung mit Glucocorticoiden ist glockenförmig und gleicht damit denen vieler anderer Stimuli, mit der größten Freisetzung von MIF bei geringen Mengen an Stimulantien. Dieses Phänomen ist nicht auf Makrophagen allein beschränkt, da ähnliche Beobachtungen auch mit Synoviozyten gemacht worden sind (Leech, 1999).

Trotz der gemeinsamen Freisetzung von MIF und ACTH aus Hypophysenzellen und der Stimulierung von Makrophagen durch Glucocorticoide zur Produktion von MIF, ist MIF ein Gegenspieler der antiinflammatorischen Wirkungen der Glucocorticoide. Dies zeigt sich einerseits durch die Erhöhung der durch Glucocorticoide reduzierten Konzentration von inflammatorischen Zytokinen in Monozyten in vitro (Calandra, 1995) und andererseits durch die Aufhebung der protektiven Effekte von Glucocorticoiden in Modellen der Arthritis und Endotoxämie durch Injektion von MIF in vivo (Calandra, 1995, Santos, 2001). Bis heute weiß man nicht genau, wie MIF diese Wirkungen der Glucocorticoide hemmt. Eine Möglichkeit, wie MIF als Gegenspieler der Glucocorticoide fungieren kann, ist über die

Aktivierung der Kinase ERK-1/2, (Mitchell, 1999). Aktivierte ERK phosphoryliert eine Vielzahl von zytosolischen Proteinen und Transkriptionsfaktoren wie cPLA₂ (cytosolic phospholipase A₂). cPLA₂ ist eine wichtige Komponente der proinflammatorischen Kaskade und ihr Produkt, die Arachidonsäure, ist ein Vorläufer für die Produktion von Prostaglandinen und Leukotrienen. Weil cPLA₂ ein wichtiges intrazelluläres Ziel für die antiinflammatorische Wirkung von Glucocorticoiden darstellt, könnte die MIF-induzierte Aktivierung von cPLA₂ ein Mechanismus sein, wie MIF die von Glucocorticoiden hervorgerufene Immunsuppression teilweise wieder rückgängig machen kann. Dies konnte in L929 Fibroblasten nachgewiesen werden, indem die durch Glucocorticoide induzierte Hemmung der Freisetzung von Arachidonsäure aus diesen Zellen durch MIF wieder aufgehoben werden konnte (Mitchell, 1999).

MIF kommt auch in den Insulin-produzierenden β -Zellen der Bauchspeicheldrüse vor (Waeber, 1997). Dort liegt MIF in großer Menge als mRNA und Protein in Lagerhansschen Zellen vor und colokalisiert mit Insulin in sekretorischen Granula. Ansteigende Glukosekonzentrationen erhöhen die Expression und Sekretion von MIF. MIF selbst stimuliert die Freisetzung von Insulin. Dies zeigte sich in einem Experiment, in dem durch die Gabe von rekombinantem MIF die durch Glukose induzierte Sekretion von Insulin um 140 % gesteigert werden konnte (Waeber, 1997).

1.1.5. MIF als Enzym

Die dreidimensionale Struktur von MIF ähnelt keinem anderen Zytokin oder Hypophysenhormon und stellt damit eine neue Proteinsuperfamilie da. Die einzig bekannten Proteine, die strukturelle Ähnlichkeiten mit MIF aufweisen, sind die Dopachrom-Tautomerase (Sugimoto, 1997) und die prokaryontischen Enzyme 4-Oxalocronat-Tautomerase, 5-Carboxymethyl-2-hydroxymuconat-Isomerase (CHMI) und Chorismat-Mutase (Sun, 1996). Nicht nur auf struktureller Ebene zeigt sich eine Ähnlichkeit zwischen MIF und diesen Enzymen, sondern auch in der Sequenz. So besteht zwischen MIF und D-Dopachrom-Tautomerase eine Sequenzidentität von 27 % (Zhang, 1995) und alle Homologen besitzen N-terminal ein katalytisch aktives Prolin, welches invariant und evolutionär konserviert ist. So kam man auf den Gedanken, nach enzymatischen Wirkungen von MIF zu forschen.

Auf die Tautomeraseaktivität von MIF stieß man eher zufällig bei der Untersuchung der Biosynthese von Melanin. Bei diesem Prozess ist die enzymatische Umwandlung von

Dopachrom in 5,6-Dihydroxyindol-2-Carboxysäure (DHICA) notwendig, mit L-Dopachrom als natürlichem Substrat. Als Negativ-Kontrolle für die Überprüfung der beteiligten Enzyme wurde deswegen das nichtphysiologische D-Dopachrom benutzt. Zur Überraschung der Forscher gab es zwei Enzyme aus dem Melanozytenlysat, die in der Lage waren, D-Dopachrom umzusetzen. Diese beiden Substanzen waren D-Dopachrom-Tautomerase und MIF (Zhang, 1995). Auf der Suche nach weiteren Substraten für die Tautomeraseaktivität von MIF stieß man auf Phenylpyruvat und Hydroxyphenylpyruvat (Rosengren, 1997). Bei der Umsetzung dieser beiden Stoffe fungiert MIF als Keto-Enol-Isomerase. Diese Substrate haben den Vorteil, dass sie physiologisch vorkommen, da sie Abbauprodukte von Tyrosin und Phenylalanin sind. Dennoch ist die Michaelis-Konstante zu hoch für die physiologisch vorkommende Menge an Substrat, so dass man nicht von einer natürlichen Funktion von MIF sprechen kann.

Eine weitere enzymatische Wirkung von MIF ergab sich aus der Sequenz. MIF besitzt ein Cys-X-X-Cys Motiv, das charakteristisch für Thiol-Protein-Oxidoreduktasen ist. Oxidoreduktaseaktivität hängt von der Formation und Reduktion von Disulfidbrücken zwischen zwei konservierten Cysteinresten ab. Dies konnte durch die Reduktion der Disulfide in Insulin und 2-Hydroxyethyl-disulfid mit MIF nachgewiesen werden (Kleemann, 1998).

Weitere natürlich vorkommende Substrate für MIF sind Stoffwechselprodukte von Katecholaminen. MIF ist in der Lage, die Umwandlung von 3,4-Dihydroxyphenylaminochrom und Norepinephrinochrom, toxische Quinonprodukte der Neurotransmitter Catecholamin-3,4-Dihydroxyphenylamin und Norepinephrin, in Indoldihydroxy-Derivate zu katalysieren (Matsunaga, 1999a, Matsunaga, 1999b). MIF könnte somit eine Rolle bei der Detoxifikation von Katecholaminprodukten spielen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bis heute keine physiologisch relevante enzymatische Wirkung von MIF in vivo bewiesen worden ist. Dies liegt an den nicht natürlich vorkommenden Substraten, den zu hohen Werten für die Michaelis-Konstanten im Vergleich zu der endogen vorkommenden Menge an Substrat und vor allem an den fehlenden in vivo Daten, da fast alle Versuche in vitro durchgeführt wurden. Trotzdem bleibt die enzymatische Aktivität ein interessanter Aspekt von MIF und ein möglicher Schlüssel für manche biologische Funktion.

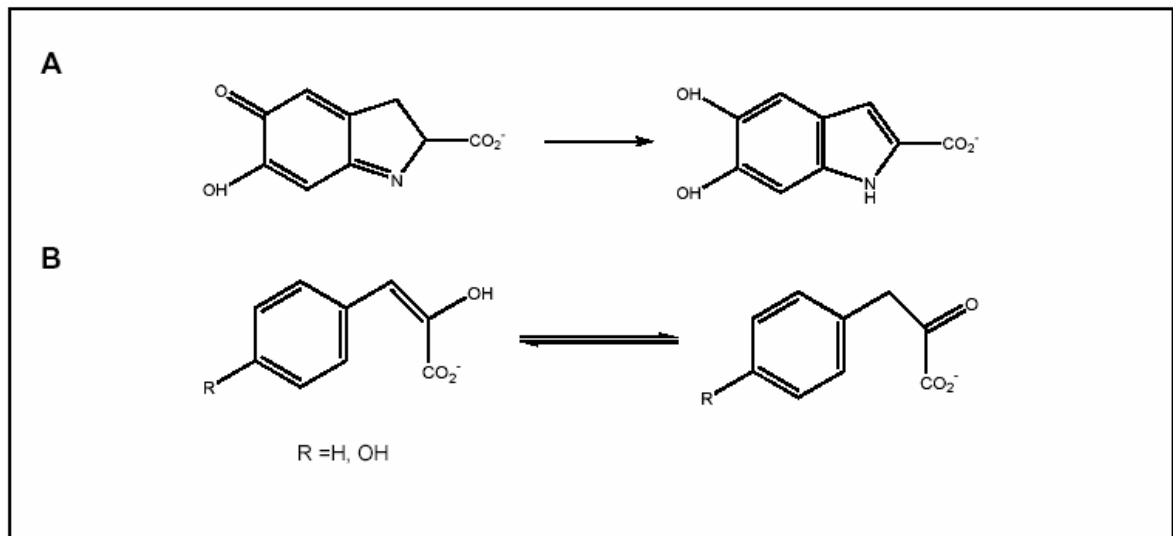


Abbildung 2:
Enzymatische Reaktionen von MIF. A D-Dopachrom-Tautomerase (Rosengren, 1996) **B** Phenylpyruvat-Tautomerase (Rosengren, 1997)

1.1.6. Die Rolle von MIF bei Krankheiten

Die Tatsache, dass MIF starke proinflammatorische Eigenschaften besitzt und wichtige Funktionen in der angeborenen Immunantwort zur Abwehr von Krankheitserregern und deren Produkten übernimmt, rückte MIF in den Fokus der Ursachenforschung für Krankheiten. Es konnte gezeigt werden, dass MIF bei einer Vielzahl von Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielt. Dies ist vor allem bei chronischen und akut-entzündlichen Erkrankungen der Fall.

Beim endotoxischen Schock konnte als erstes ein Zusammenhang zwischen erhöhten MIF-Konzentrationen und einem akut-entzündlichen Krankheitsgeschehen festgestellt werden. Dies wurde mit Hilfe eines Tiermodells untersucht, in dem durch intraperitoneale Injektion von LPS in Mäuse ein Schockzustand herbeigeführt wurde (Bernhagen, 1993). Die gleichzeitige Injektion von MIF und LPS erhöhte die Toxizität von LPS, was sich in der erhöhten Letalität der Mäuse, die mit der Kombination behandelt wurden, im Vergleich zu denen, die LPS alleine bekommen hatten, zeigte. Die Neutralisation von MIF durch Antikörper hingegen konnte die Mäuse vor einer tödlichen Menge LPS schützen (Bernhagen, 1993). Diese wichtige Rolle von MIF als kritischer Mediator der experimentellen Endotoxämie wurde auch durch Untersuchung an der MIF-defizienten Maus (MIF^{-/-}) bestätigt. Die Resistenz der gendefizienten Mäuse gegenüber LPS war im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen erhöht (Bozza, 1999).

Eine wichtige Rolle spielt MIF auch im Verlauf der Sepsis, einer weiteren akut-entzündlichen Erkrankung. Dies zeigt sich sowohl bei reinen gramnegativen als auch bei gemischten Formen der Sepsis. Erhöhte MIF-Werte wurden im Blut von Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock gefunden (Beishuizen, 2001, Calandra, 2000, Gando, 2001, Lehmann, 2001). Für die Untersuchung der Funktion von MIF im Krankheitsgeschehen der Sepsis wurden zwei Tiermodelle für bakterielle Peritonitis verwendet. Die Infektionen wurden entweder durch intraperitoneale Injektion von *Escherichia coli* (*E.coli*), als Modell der gramnegativen Sepsis, oder durch CLP (cecal ligation and puncture), als Modell für eine gemischte multibakterielle Sepsis, hervorgerufen. In beiden Modellen kam es nach der Infektion zu einem schnellen Anstieg der Konzentration von MIF, die zuerst im Peritoneum und etwas später systemisch beobachtet werden konnte (Calandra, 2000). Ähnlich wie im Modell des endotoxischen Schocks (Bernhagen, 1993) erhöhte eine einmalige Gabe von rekombinantem MIF am Anfang der Infektion mit *E.coli* die Mortalität. Außerdem konnten die Tiere durch Neutralisation von MIF mit Antikörpern vor der letalen Peritonitis geschützt werden. Im Fall der durch CLP hervorgerufenen Infektion wurde dieser Schutz sogar noch acht Stunden nach dem Eingriff erreicht. Dies ist ein wichtiges Ergebnis für die eventuelle spätere Anwendung in der Klinik, da Patienten erst nach der Manifestation und Diagnose der Sepsis behandelt werden können und nicht, wie die Tiere im Modell, schon am Anfang der Infektion. Die Neutralisation von MIF schwächt die Immunabwehr nicht, was einen möglichen späteren Einsatz von Antikörpern gegen MIF beim Menschen wahrscheinlicher macht. Diese Erkenntnis erlangte man durch zweistündige Vorbehandlung von Mäusen mit Antikörpern gegen MIF, bevor sie mit *E.coli* belastet wurden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Sterberate nicht erhöht, obwohl die Plasmawerte der Entzündungsparameter TNF und IL-6 durch die Neutralisation von MIF reduziert waren (Calandra, 2000). Dies ist ein wesentlicher Unterschied gegenüber der Neutralisation von TNF, einem wichtigen Entzündungsmediator, da durch die Gabe von Antikörpern gegen TNF die Versuchstiere immunsupprimiert und deswegen anfälliger für Infektionen werden (Echtenacher, 1990).

Die herausragende Stellung von MIF bei der Behandlung der Sepsis im Tiermodell wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass TNF-defizienten Mäuse (TNF^{-/-}) durch das Verabreichen von Antikörpern gegen MIF vor einer letalen CLP bewahrt werden (Calandra, 2000). Somit ist es durch die Neutralisation von MIF möglich, die starke Entzündungsreaktion am Anfang einer Sepsis zu verringern, ohne die Immunabwehr zu schwächen.

Die Beteiligung von MIF konnte auch für den Krankheitsverlauf des grampositiven toxischen Schocks nachgewiesen werden. Makrophagen, die mit geringen Konzentrationen von TSST-1 (toxic shock syndrome toxin 1) und Streptokokken-Exotoxin-A behandelt wurden, sezernierten MIF (Calandra, 1998). Durch die Neutralisation von MIF mit Antikörpern konnten in vivo Mäuse, welche mit Galaktosamin sensitiviert worden waren, vor dem durch TSST-1 ausgelösten toxischen Schocksyndrom geschützt werden (Calandra, 1998). Grund für diesen Schutz könnte die verminderte Aktivität der Lymphozyten sein. Ein weiterer Beweis für eine wichtige Funktion von MIF beim grampositiven Schock ist die Resistenz der galaktosaminsensitisierten MIF^{-/-} Maus für den durch Staphylokokken-Enterotoxin-B ausgelösten Schock (Bozza, 1999).

Bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen spielt MIF ebenfalls eine entscheidende Rolle. So wurden in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis fünf- bis zehnfach höhere Spiegel von MIF, im Vergleich zu gesunden Probanden, gefunden (Leech, 1999). Die Wirksamkeit der Neutralisation von MIF bei der rheumatoiden Arthritis konnte durch ein Tiermodell bewiesen werden. Antikörper gegen MIF schwächten den Entzündungsprozeß in einer Typ II Collagen-induzierten Arthritis ab und trugen so zum Heilungsprozeß bei (Mikulowska, 1997). In weiteren Tiermodellen für Arthritis konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Erkrankung und MIF nachgewiesen werden (Leech, 1998, Leech, 1999, Santos, 2001). Ein möglicher Mechanismus, wie MIF in das Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis eingreift, ist über die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP). MIF erhöht die mRNA-Spiegel von MMP-1 und MMP-3 in synovialen Fibroblasten (Onodera, 2000). Diese beiden stehen im Verdacht, einen großen Anteil an der Degradierung von extrazellulären Matrixbestandteilen bei der rheumatoiden Arthritis zu haben. So könnte durch Neutralisation von MIF die de-novo-Synthese von MMP unterdrückt und damit der schädliche Abbauprozeß verlangsamt werden.

Auch bei chronischen Entzündungen der Lunge wurden erhöhte Spiegel von MIF nachgewiesen. So wurde ein hoher Gehalt an MIF in den Alveolen von Patienten, die an ARDS (acute respiratory distress syndrome) leiden, festgestellt (Donnelly, 1997). MIF induziert bei dieser Krankheit die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-6, die eine wichtige Funktion bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Entzündung haben. Durch die Gabe von Antikörpern gegen MIF konnte die Sekretion dieser proinflammatorischen Zytokine signifikant reduziert werden. Weiterhin enthielt die Flüssigkeit der Bronchoalveolarlavage von Patienten mit Asthma signifikant erhöhte MIF-Werte im Vergleich zu gesunden Probanden (Rossi, 1998). Weitere Lungenerkrankungen

bei denen MIF eine Rolle spielt, sind Tuberkulosis und Wegener`s Granulomatosis (Yamada, 2002). Diese Daten zeigen, dass MIF zum Entzündungsgeschehen bei chronischen Lungenkrankheiten beiträgt.

Darüber hinaus wurde eine erhöhte Expression von MIF bei Krankheiten wie Glomerulonephritis (Lan, 2000, Matsumoto, 2001), Colitis und Morbus Crohn (de Jong, 2001, Murakami, 2001), Dermatitis (Shimizu, 1997), Psoriasis (Steinhoff, 1999), systemischer Sklerosis (Selvi, 2003), Typ-II Diabetes (Yabunaka, 2000), Pancreatitis (Sakai, 2003), Multipler Sklerosis (Niino, 2000), Uveitis (Kitaichi, 1999), Iridocyclitis (Kitaichi, 2000), Atherosklerosis (Burger-Kentischer, 2002), Otitis (Kariya, 2003), und Lupus erythematosus (Foote, 2004) nachgewiesen

Die Überexpression von MIF ist bei entzündlichen Erkrankungen für die Progression oder zumindest für die Aufrechterhaltung der Krankheit verantwortlich. Dies zeigten Tier- und Zellexperimente, in denen die Neutralisation von MIF zur Verbesserung der Krankheitssymptome beitrug. Bis heute ist mit der *Leishmania major*-Infektion von Mäusen nur ein Tiermodell bekannt, in der die Applikation von exogenem MIF zum Schutz in der Erkrankung führte (Xu, 1998). Dabei aktiviert MIF Makrophagen zur Ausschüttung von TNF und Stickoxid und damit zur Abtötung der Parasiten (Juttner, 1998).

Viele Veröffentlichungen der letzten Jahre legen die Vermutung nahe, dass MIF bei der Regulierung der Zellproliferation und der Tumorangiogenese involviert ist (Chesney, 1999, del Vecchio, 2000, Kleemann, 2000, Ogawa, 2000, Shimizu, 1999, Takahashi, 1998, Yang, 2000). Erste Hinweise darauf fand man in murinen Kolonkarzinomzellen, in denen eine erhöhte Expression von MIF im Zytosol festgestellt wurde. Diese Überexpression von MIF war verbunden mit einer erhöhten Proliferation der Krebszellen (Takahashi, 1998). Weiterhin konnte eine andere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Neutralisation von MIF durch Antikörper das Ausbrechen von B-Zell-Lymphomen bei Mäusen drastisch reduzierte (Chesney, 1999). Dieses Phänomen ist aber nur für die initiale Wachstumsphase des Tumors nachweisbar, da Antikörper gegen MIF das Wachstum von etablierten Tumoren kaum beeinflussen konnten. Die Erklärung hierfür ist, dass die Neutralisation von MIF zu einer Hemmung des Zellwachstums von Endothelzellen und einer reduzierten Anzahl von Tumorkapillaren führt, nicht aber die Proliferation der Lymphomzellen beeinflusst (Chesney, 1999). Weitere Veröffentlichungen unterstützen die Wirksamkeit der anti-MIF-Therapie in humanen und murinen Zelllinien (Ogawa, 2000, Shimizu, 1999). In diesem Zusammenhang wurde auch die Wirkung von rekombinantem MIF auf die Zellproliferation untersucht. Dabei fand man heraus, dass MIF die Effekte von wachstumsstimulierenden

Faktoren erhöht, aber allein keine Wirkung zeigte (Yang, 2000). Die proliferationsfördernden Eigenschaften konnten durch die Neutralisation von MIF aufgehoben werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass MIF eine Rolle in der frühen Wachstumsphase und Angiogenese von Tumoren spielt. Die wachstumsfördernden Eigenschaften von MIF sind indirekt, aber dennoch relevant für die Ausbildung mancher Tumoren. Die Expression von MIF scheint indirekt proportional zum Tumorentwicklungsstadium zu sein, das heißt, je geringer der Tumor entwickelt ist, umso höher ist der Gehalt an zytosolischem MIF (del Vecchio, 2000).

1.2. Sepsis und septischer Schock

Die Sepsis ist nach den koronaren Herzerkrankungen eine der häufigsten Todesursachen beim Menschen. Und die Problematik nimmt weiter zu, da die Inzidenz der Sepsis sich über die Jahre erhöht. So steigerte sich die Anzahl von Sepsispatienten in den USA von 82,7 pro 100.000 Einwohner im Jahr 1979 auf 240,4 pro 100.000 Einwohner im Jahr 2001. Dies entspricht einer jährlichen Steigerungsrate von 8,7 % (Martin, 2003). In diesen Studien konnte auch gezeigt werden, dass Männer häufiger an Sepsis erkranken als Frauen und dass die Bedeutung von grampositiven Keimen und Pilzen als Infektionserreger für Sepsis zunimmt. Positiv bewertet werden kann, dass die Mortalitätsrate bei Sepsispatienten aufgrund besserer Behandlungsmethoden über die Jahre abnahm. So sank die Sterblichkeit an Sepsis in den USA von 27,8 % im Jahr 1979 auf 17,9 % im Jahr 1995 (Martin, 2003). Dennoch stellt die Sepsis in der Klinik eine immer größer werdende Kosten- und Krankheitsursache dar, die durch gezielte Forschung bekämpft werden soll.

Die moderne Definition der Sepsis wurde 1989 von Bone postuliert (Bone, 1989) und lautet: „Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion“. Diese recht allgemeine Definition wurde zwei Jahre später von einer Konsensus-Konferenz des *American College of Chest Physicians* und der *Society of Critical Care Medicine* erweitert (Bone, 1992). Bei dieser Konferenz wurden Definitionen von medizinischen Fachbegriffen, die eine wichtige Rolle in der Sepsis spielen, neu definiert und ein Kriterienkatalog für die Diagnose der Sepsis erstellt. Aufgrund dieser Neuerung kann das Krankheitsbild nun genau umrissen werden. Eine schwere Sepsis liegt dann vor, wenn: 1. Die Inflammation

einen infektiösen Ursprung hat, 2. Eine systemische inflammatorische Wirtsreaktion vorliegt und 3. Es zu einer infektionsbezogenen Organdysfunktion kommt.

Auch der septische Schock wird klar definiert. Die ersten beiden Kriterien sind identisch mit denen der Sepsis. Nur beim dritten Punkt wird anstatt der infektionsbezogenen Organdysfunktion der Nachweis einer arteriellen Hypotonie trotz adäquater Volumentherapie verlangt. Alle drei Kriterien müssen für die jeweilige Diagnose der Sepsis oder des septischen Schocks erfüllt werden. Die einzelnen Punkte sind genau untergliedert, so dass die Diagnosestellung für den Arzt erleichtert wird.

Bei der Entstehung einer Sepsis sind eine Infektion und die darauf folgende Immunantwort von entscheidender Bedeutung. Dabei ist die Art des Infektionserregers unerheblich. Alle Erreger, egal ob bakterieller, fungaler, viraler oder parasitärer Art, sind in der Lage, eine Sepsis auszulösen. Die Infektion aktiviert das Immunsystem und führt so zur Ausschüttung der primären Inflammediatoren TNF und IL-1. Diese wiederum setzen ihrerseits sekundäre Mediatoren frei, die den Entzündungsprozeß weiter vorantreiben. Die Inflammation wird durch Gegenmaßnahmen gedämpft. Dies geschieht durch die Bildung antiinflammatorischer Substanzen (z.B. lösliche TNF-Rezeptoren, IL-1-Rezeptor-antagonisten, IL-4, IL-10) sowie durch Apoptose immunkompetenter Zellen. Die pro- und antiinflammatorische Antwort des Immunsystems auf eine Infektion spielt eine entscheidende Rolle bei der Sepsis, jedoch ist der Mechanismus der Entstehung und Manifestation der Erkrankung bis heute nicht genau geklärt.

Die Immunantwort im Verlauf einer Sepsis führt zur Beeinträchtigung einer Reihe von Körperfunktionen. So wird das Gerinnungssystem derart beeinflusst, dass es zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung kommt. Dabei ist eine erhöhte Expression von tissue factor auf Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen für die Aktivierung des Gerinnungssystems verantwortlich. Zu einer verstärkten Gerinnung trägt auch die Hemmung physiologischer Antikoagulantien, wie Antithrombin III, Protein C/Protein S-System und Tissue Factor Pathway Inhibitor bei.

Endothelzellen exprimieren während der Sepsis auch Adhäsionsmoleküle, was dazu führt, dass Leukozyten verstärkt aktiviert werden und zytotoxische Substanzen freisetzen. Diese Reaktion ist zwar sinnvoll, was die Bekämpfung des Infektionserregers betrifft, schädigt aber gleichzeitig die am Infektionsort befindlichen Endothelzellen. Die Endothelzellschäden bewirken Störungen der Mikrozirkulation, sowie die Ausbildung eines Kapillarlecks, das den Austritt intravasaler Flüssigkeit in das Interstitium bewirkt. Der massive Flüssigkeitsverlust verursacht einen intravasalen Volumenmangel.

Während der hyperinflammatorischen Phase einer Sepsis werden Entzündungsmediatoren freigesetzt, welche die endotheliale NO-Synthetase stimulieren und damit zur Freisetzung von Stickoxid (NO) führen. NO selbst ist ein starker Vasodilator, der in höheren Konzentrationen eine arterielle Hypertension verursacht, eine charakteristische Begleiterscheinung des septischen Schocks. Die Vasodilatation verringert die kardiale Vorlast durch den fehlenden venösen Rückstrom und führt so noch zusätzlich zum Flüssigkeitsverlust über das Kapillarleck.

Charakteristisch für das Krankheitsbild der Sepsis sind weiterhin Kardiomyopathie und endokrine Dysfunktion. Die endokrine Dysfunktion äußert sich vor allem durch eine relative Nebennierenrindeninsuffizienz sowie eine inadäquate Vasopressin- und Insulinsekretion. Die ausgeprägten kardiozirkulatorischen Störungen, die auch die Organperfusion und Mikrozirkulation betreffen, begünstigen die Entstehung eines Multiorgandysfunktionssyndroms, der häufigsten Todesursache in dieser Patientengruppe.

Bei der Behandlung der Sepsis ist zu unterscheiden, ob der Patient einen septischen Schock hat oder nicht. Befindet sich der Kranke im Schockzustand, so hat die Bekämpfung dieses kritischen Zustands oberste Priorität, da unzureichende Organperfusion zu schweren Schäden oder sogar zum Tod führen kann. Deswegen ist eine schnelle Herstellung des hämodynamischen Gleichgewichts durch Volumenexpansion und die Gabe von Vasopressoren von entscheidender Bedeutung (Sessler, 2004). Zur Volumenexpansion stehen kolloidale Lösungen, wie 4% Albumin, oder kristalline Lösungen, wie Natriumchlorid, zur Verfügung (Marx, 2003). Wenn die Volumentherapie allein nicht zur Wiederherstellung des hämodynamischen Gleichgewichts ausreicht, werden Vasopressoren eingesetzt (Dellinger, 2004). Aus dieser Gruppe sind vor allem Norepinephrin und Dopamin als First-line-Therapeutika zu nennen.

Befindet sich der Patient in einem stabilen Zustand, kann mit der Bekämpfung des Infektionserregers begonnen werden. Dies sollte möglichst schnell nach der Diagnose der Sepsis oder des septischen Schocks erfolgen, um eine Ausbreitung der Krankheitserreger im Körper des Patienten zu verhindern. Wenn möglich, wird der Infektionsherd entfernt, ansonsten wird ein Breitbandantibiotikum, das gegen die häufigsten Sepsiserreger wirkt und gut in verschiedene Gewebe penetrieren kann, intravenös gegeben (Dellinger, 2004). Die Antibiotikatherapie sollte so schnell wie möglich, nachdem der oder die Keime bekannt sind und deren Sensitivität gegenüber Antibiotika bestimmt worden ist, auf ein für den Erreger spezifisches Medikament umgestellt werden. Dadurch wird eine gezielte und effektive Bekämpfung des Erregers möglich und die Bildung von Resistenzen wird verhindert.

Als adjuvante Therapie der Sepsis ist die Applikation von rekombinantem humanem aktiviertem Protein C (rhAPC) oder Glucocorticoiden möglich. rhAPC ist die erste adjuvante Therapieform mit der die Sterblichkeit bei Fällen von schwerer Sepsis, gemessen in den ersten 28 Tagen nach Diagnosestellung, gesenkt werden konnte. Protein C (PC) ist ein natürlich vorkommendes Vitamin-K-abhängiges Protein, das in der Leber synthetisiert wird. Seine aktivierte Form, welche durch proteolytische Spaltung entsteht, besitzt neben der Eigenschaft als Inhibitor der Thrombin-Herstellung auch antiinflammatorische und profibrinolytische Funktionen (Bernard, 2001). Welche dieser drei Eigenschaften, oder ob alle zu gleichen Teilen zum verbesserten Überleben bei schwerer Sepsis beitragen, ist nicht bekannt. Allerdings besitzt die Therapie mit rhAPC auch einige Nachteile. So ist die Behandlung sehr kostenintensiv und das Risiko für schwere Blutungen ist erhöht. Deswegen werden nur Patienten, die an einer schweren Sepsis leiden, ein hohes Sterberisiko haben und kein erhöhtes Blutungsrisiko besitzen, mit rhAPC behandelt (Dellinger, 2004).

Eine andere Möglichkeit der adjuvanten Therapie bei einer Sepsis sind Glucocorticoide. Bei früheren Studien mit hohen Dosen von Glucocorticoiden (größer als 300 mg pro Tag) konnte in der Mehrzahl der Fälle keine Verbesserung im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Keh, 2004). In einigen Studien kam es sogar zu einer Erhöhung der Sterblichkeitsrate unter der Behandlung mit hohen Dosen von Glucocorticoiden. Deswegen wurden die Glucocorticoide lange Zeit bei der Therapie der Sepsis vermieden. Erst vor kurzem konnten neuere Studien zeigen, dass die Gabe von niedrigen Dosen an Glucocorticoiden (200 – 300 mg pro Tag) zu einem Überlebensvorteil bei einer Sepsis führt. Heute ist die intravenöse Applikation niedriger Dosen von Glucocorticoiden zur Therapie der Sepsis in den meisten Fällen Standard (Keh, 2004). Der Einsatz von Glucocorticoiden und die individuelle Dosierung hängen jedoch vom Schweregrad der Sepsis ab.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei der Sepsis um eine schwere Krankheit mit oft tödlichem Ausgang handelt. Sie erfordert ein hohes Maß an klinischer, kostenaufwendiger Betreuung. Neuere Studien und die Aufklärung der genauen Pathophysiologie der Erkrankung können in der Zukunft helfen, die Therapie der Sepsis zu verbessern.

1.3. Immunparalyse

Unter dem Begriff Immunparalyse versteht man den Extremfall einer gegenregulatorischen Suppression des Immunsystems, die durch Entzündung, apoptotischen Gewebeuntergang oder Stressreaktionen hervorgerufen wird (Thiel, 2000).

Die systemische Entzündung selbst, der häufigste Auslöser der Immunparalyse, kann verschiedene Ursachen haben. In den meisten Fällen liegt eine Infektion mit Mikroorganismen vor. Aber auch ohne die Invasion von Fremdkörpern, wie bei Traumata, Verbrennungen oder schweren Operationen, kann es zu systemischen Entzündungen kommen. Das Entscheidende ist, dass ein permanenter Entzündungsreiz vorliegt, der zu einer systemischen Reaktion führt. Die systemische Entzündung geht einher mit einer erhöhten Produktion und Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, der starken Aktivierung des Immunsystems, der Produktion von Akut-Phase-Proteinen in der Leber, der Induktion von Fieber und einer neuroendokrinen Stressreaktion, der schnelleren Ausreifung und Ausschüttung von unspezifischen Abwehrzellen und der erhöhten Bereitstellung von Energie durch Umschalten vom anabolen auf katabolen Stoffwechsel (Hoflich, 2002). Das Ganze wird als systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) bezeichnet.

Während des SIRS befindet sich der Organismus in einem hyperinflammatorischen Zustand. Zur Regulierung der starken Entzündung werden systemisch antiinflammatorisch wirkende Stoffe ausgeschüttet. Die Gegenregulation wird durch Zellen des Immunsystems selbst und durch das zentrale Nervensystem (ZNS) induziert. Dabei bewirken die proinflammatorischen Stoffe, die während der Entzündung freigesetzt werden, eine negative Rückkopplung auf manche ihrer Produzentenzellen. Die autokrine Hemmung wird durch die Induktion und Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen, wie IL-10, deutlich. Diese wiederum lösen die Synthese von hemmenden Faktoren, wie löslichen TNF-Rezeptoren und IL-1-Rezeptorantagonisten, aus. Das bedeutet, dass die Zellen, die vorher proinflammatorischen Stoffe sezerniert haben, zur Produktion von antiinflammatorischen Faktoren wechseln (Hoflich, 2002).

Weiterhin lösen proinflammatorische Zytokine im ZNS eine systemische Stressreaktion aus, während der es ebenfalls zur Sekretion von antiinflammatorischen Mediatoren kommt und damit auch zur Gegenregulation der Entzündung.

Die antiinflammatorischen Reaktionen, die nach einem SIRS ablaufen, lassen sich unter dem Begriff des kompensatorischen antiinflammatorischen Response-Syndroms (CARS) zusammenfassen (Hoflich, 2002).

Auch ohne systemische Entzündung kann es zu systemischen antiinflammatorischen Maßnahmen kommen und somit zur Immundepression. So bewirken starke Stressreaktionen, wie nach einem Herzinfarkt oder Schlaganfall, die Ausschüttung von antiinflammatorischen Mediatoren.

Weiterhin führen starke apoptotische Gewebsuntergänge, wie zum Beispiel nach akutem Leberversagen, zu einer Immunsuppression. Apoptotische Zellen, die von Makrophagen und dendritischen Zellen aufgenommen werden, veranlassen CD4 T-Zellen zu einer Verschiebung der Immunantwort nach Th2. Dadurch kommt es zu einer Ausschüttung von antiinflammatorischen Zytokinen, wie IL-4 und IL-10, und damit zu einer Suppression des Immunsystems (Sessler, 2004).

Im Zuge der Gegenregulation einer Entzündung kommt es meistens zur Aktivierung aller immunsupprimierender Mechanismen. Die Suppression nach einem CARS hält jedoch länger an als bei den zwei anderen oben erwähnten Arten.

Allgemein führen die antiinflammatorischen Gegenreaktionen zu einer Einschränkung der inflammatorischen Abwehrmechanismen. Das Immunsystem ist nicht mehr in der Lage, adäquat auf Erreger zu reagieren, und damit steigt die Gefahr von nosokomialen Infektionen stark an. Nur die Extremform dieser Gegenregulation, die totale Ausschaltung des Immunsystems, wird als Immunparalyse bezeichnet.

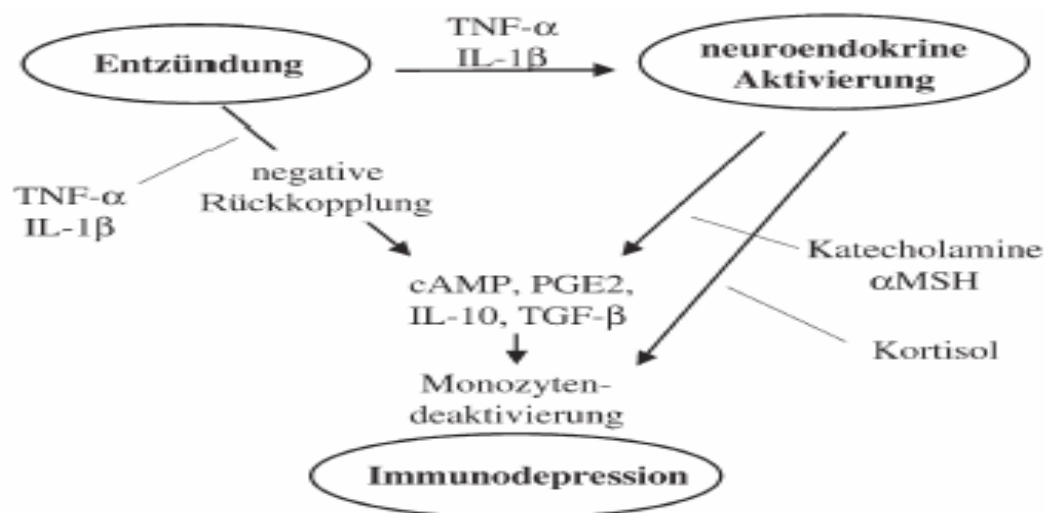


Abbildung 3:
Entstehung der Immundepression. (Hoflich, 2002)

1.4. Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit ist es, durch Modulation des Immunsystems eine Verstärkung der Immunantwort bei der Sepsis-bedingten Immunsuppression zu erreichen. Dabei wurden die immunmodulatorischen Eigenschaften von MIF untersucht, da bereits bekannt war, dass die Neutralisation von MIF im Tiermodell vor den letalen Folgen des septischen Schocks schützen konnte (Calandra, 2000). Der Einfluss von MIF auf die Sepsis-bedingte Immunparalyse sollte an Hand eines Tiermodells, der CLP, untersucht und die Ergebnisse auf ihre Relevanz für den Menschen analysiert werden, indem sie mit den Daten aus einer humanen Sepsisstudie verglichen wurden.

2. Material

2.1. Chemikalien und Reagenzien

2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure(6)) (ABTS)	Boehringer Mannheim
ABTS Substrat Puffer	Boehringer Mannheim
Acrylamid-Bisacrylamid Lösung	Roth, Karlsruhe
Actinomycin D	Sigma Aldrich, Steinheim
Agarose, electrophoresis grade	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Bovine Serum Albumine (BSA)	Boehringer, Mannheim
Chloroform	Fluka, Buchs, Schweiz
Coomassie Brilliant Blue R 250	Fluka, Buchs, Schweiz
L-3,4 Dihydroxyphenylalaninmethylester	Sigma Aldrich, Steinheim
Desoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Gentamycin	ICN, Meckenheim
Ketaminhydrochlorid 5%	WDTeG Garbsen
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Natrium-meta-perjodat	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	Sigma Aldrich, Steinheim
PCR-Puffer, 10x conc.	Roche Diagnostics, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Polyethylenglycol (PEG) 400	Apotheke der Uni-Klinik Regensburg
RPMI 1640-Pulvermedium	Sigma Aldrich, Steinheim
Saccharose	Sigma Aldrich, Deisenhofen
SIGMA 104	Sigma Aldrich, Steinheim
Skinman® soft Händedesinfektionsmittel	Ecolab Deutschland GmbH, Düsseldorf

TEMED	Sigma Aldrich, Steinheim
TRIzol Reagenz	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Tween 20	Fluka, Buchs, Schweiz
Xylazinhydrochlorid 2%	WDTeG Garbsen

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen und hatten den Reinheitsgrad p.a..

2.2. Verbrauchsmaterial und Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent, Waldbronn
Agilent Bioanalyzer RNA-Chip	Agilent, Waldbronn
ATB nephelometer	Biomerix, New York, USA
Begasungsbrutschrank – Cell Safe	Integra Biosciences, Baar, Schweiz
Dry Slide Oxidasetest	Becton Dickinson
Eppendorfcups (1,5 ml / 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Plastik-Pistille	Eppendorf, Hamburg
ELISA Reader	MWG Biotech, Ebersberg
Filter:	Nanosep MF 0,2 µm
	Nanosep 30K Omega
FACS Röhrchen	Pall GmbH, Dreieich
Gelelektrophoreseapparaturen	Pall GmbH, Dreieich
Gewebekulturschalen	Labor Schubert, Schwandorf
Hyperfilm ECL	BioRad, München
Inkubatoren	Becton-Dickinson, Heidelberg
Kontaminationsmonitor	Amersham, Braunschweig
	Heraeus, Hanau
	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Kryo-Röhrchen	Nunc, Naperville
Mikroskop	Olympus, Hamburg
Mikrotiterplatten	Falcon, Heidelberg
Neubauer Zählkammer	Brand, Giessen
Nitrocellulosemembran	Osmonics, Minnetonka, USA
PCR-Thermocycler	Perkin Elmer, Shelton, USA

Photometer	Ultrospec II	Amersham, Buckinghamshire, England
Polystyrolröhrchen		Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße		Eppendorf, Hamburg
Spannungsgerät:	Biorad 200/2,0 Constant Voltage	BioRad, München
Sterilbank	Laminair Flow® HB 2448	Heraeus, Hanau
Szintillationszähler	TR Packard 10600 Tri-Carb	PerkinElmer, Boston, USA
Ultra Turrax		IKA Labortechnik, Staufen
UV-Schirm (254 nm und 366 nm)		Bachhofer, Reutlingen
Waagen:	Sartorius R16OP	Sartorius, Göttingen
	Sartorius L2200S	Sartorius, Göttingen
Whatman Filterpapier		Laborcenter, Nürnberg
Wundklammern nach Michel 7,5x1,75 mm		Tierärztebedarf Lehnecke, Schortens
Zeiss Mikroskop		Leitz, Wetzlar
Zellkulturflaschen (70, 250, 750 ml)		Falcon Heidelberg
Zentrifugen:	Beckmann J2-21 M/E Zentrifuge	Beckmann, München
	Beckmann L-70 Ultrazentrifuge	Beckmann, München
	Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)		Falcon, Heidelberg
Zellsiebe – Cellstrainer		Falcon, Heidelberg

2.3. Kits

Corticosteron RIA	IBL, Hamburg
ECL Western Blot Detection Kit	Energene, Regensburg
ELISAs:	R&D Systems, Wiesbaden
murines IL-6	R&D Systems, Wiesbaden
murines TNF	R&D Systems, Wiesbaden
murines MIF	R&D Systems, Wiesbaden
humanes MIF	R&D Systems, Wiesbaden
Mycoplasma detection kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Griess-Reagenz-System	Promega, Madison, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim

2.4. Molekulargewichtsstandards

DNA-Längenstandard (XIV)	Roche Diagnostics, Mannheim
SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Rainbow [®]	Amersham, Buckinghamshire, England

2.5. Antikörper und Enzyme

Antikörper:

Anti-Maus-MIF (polyklonale Kaninchenantikörper)	eigene Herstellung
Anti-Maus-TNF (V1q , Ratten IgD)	Echtenacher, 1990
Anti-Hase-IgG-POX	Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-Hase-IgG-AP	Sigma Aldrich, Steinheim

Enzyme:

Flavin-adenin-diphosphat (FAD)	Sigma Aldrich, Steinheim
Lactat Dehydrogenase (LDH)	Sigma Aldrich, Steinheim
Nitratreduktase	Roche Diagnostics, Mannheim
β-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADPH)	biomol, Hamburg
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim

2.6. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma metabion (Martinsried) synthetisiert. Alle Sense-Primer für PCR tragen den Zusatz 5', alle Antisense-Primer tragen den Zusatz 3'.

Oligonukleotid	Sequenz
5'β-Aktin	5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT-3'
3'β-Aktin	5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC-3'
5'mTNF	5'-GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C-3'
3'mTNF	5'-ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G-3'

2.7. Puffer und Lösungen

Beschichtungspuffer für ELISA	50 mM NaHCO ₃ pH 9.2
Blockierlösung für ELISA	10 % Magermilchpulver in PBS
Coomassie-Blau-Lösung	0,25 % Coomassie blue R250 in 45 % Methanol 10 % Essigsäure 45 % H ₂ O
Coomassie-Entfärbelösung	40 % Methanol 10 % Essigsäure 50 % H ₂ O
Dopachrom-Tautomerasetest-Lösung	25 mM K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O 25 mM KH ₂ PO ₄ 0,5 mM EDTA (pH 6,0)
Erythrozyten-Lysepuffer	150 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM NA ₂ EDTA 1 l H ₂ O (pH 7,2 – 7,4)
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in H ₂ O
Laemmli-Elektrodenpuffer (5x)	40 mM Tris Base 0,95 M Glycin
PBS	150 mM NaCl 8 mM K ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,3)
0,1% PBS-T	0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS
Sammelgel-Trispuffer	0,5 M Tris-HCl (pH 6.8)
SDS-Probenpuffer (2x)	20 % Glycerin 1,25 M TrisHCl (pH 6,8) 4 % SDS 0,02 % Bromphenolblau 10 % β-Mercaptoethanol
Substratlösung für ELISA (AP)	0,06 % (w/v) SIGMA104 in Substratpuffer
Substratpuffer für ELISA (AP)	9,8 % (v/v) Diethanolamin 24 mM MgCl ₂ pH 9.8

Material

TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl 1 mM EDTA (pH 8,3)
TBE-Puffer	89 mM Tris-HCl 89 mM H ₂ BO ₃ 2 mM EDTA (pH 8,0)
Transferpuffer A – Western Blot	0,3 M Tris Base in 20 % Methanol 80 % dem. Wasser (pH 10,4)
Transferpuffer B – Western Blot	25 mM Tris Base in 20 % Methanol 80 % dem. Wasser (pH 10,4)
Transferpuffer C – Western Blot	4 mM ε-Amino-n-Caprinsäure in 20 % Methanol 80 % dem. Wasser (pH 7,6)
Trenngel-Trispuffer	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
Trypanblau-Lösung	0,15 % Trypanblau 150 mM NaCl
Verdünnungslösung für LDH	500 mM Natriumpyruvat in H ₂ O

2.8. Zelllinien

L 929

Maus–Fibrosarkomlinie

2.9. Zytokine

rhMIF	Das rekombinante humane MIF wurde freundlicherweise von der Firma Novartis, Wien, zur Verfügung gestellt. Es wurde in <i>E.coli</i> exprimiert (pET-System in BL21 (DE3)) und endotoxin-frei gereinigt.
rhMIF (Kontrolle)	Als Kontrolle für das Molekulargewicht diente rhMIF aus dem Labor von Thierry Calandra, Lausanne, Schweiz (Bernhagen, 1994).
rhTNF	Das rekombinante humane TNF wurde freundlicherweise von der Firma BASF Bioresearch, Ludwigshafen, zur Verfügung gestellt.

2.10. Tiere

NMRI Mäuse

Charles River, Sulzfeld

2.11. Bakterien

Pseudomonas aeruginosa (PA 103)

Listeria monocytogenes (ATCC 43251)

Salmonella typhimurium (ATCC 14028s)

Pettenkofer Institut, München

Mikrobiologie, Uni-Klinik

Regensburg

Pettenkofer Institut, München

2.12. Kultivierung der Bakterien

Cetrimid Agar

CRYOBANK™

Frischblut Agar

LB medium

XLD-Agar

Mikrobiologie, Uni-Klinik

Regensburg

VWR International GmbH,

Darmstadt

Mikrobiologie, Uni-Klinik

Regensburg

GIBCO-BRL, Karlsruhe

Schleicher & Schüll, Dassel

3. Methoden

3.1. Bestimmung der mRNA-Werte aus der Milz

Um eine Kontamination mit RNAsen zu vermeiden, wurden sämtliche Arbeiten mit RNA mit Handschuhen durchgeführt. Es wurden nur sterile Glaswaren und Plastikreaktionsgefäße sowie autoklavierte Lösungen verwendet. Wasser wurde mit 0,1% Diethylcarbonat versetzt, kräftig geschüttelt, über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag vier Stunden bei 121° C autoklaviert (DEPC Wasser).

3.1.1. Isolierung von total RNA aus der Milz

Nach Entnahme der Mausmilzen wurde durch Passieren durch ein Sieb eine Einzelzellsuspension hergestellt, die gewaschen und unter gelegentlichem Schütteln in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Es folgten wiederum 2 Waschschriffe und danach wurde das Zellpellet in 3 ml Trizol resuspendiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach der Zugabe von 100 µl Chloroform und 8 Minuten Inkubation, wurde das Gemisch zentrifugiert und die obere wässrige Phase wurde abgenommen, um 1:1 mit Isopropanol gemischt zu werden. Das Gemisch wurde bei -20° C für 30 Minuten inkubiert, anschließend zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und danach in 50 ml RNase freiem Wasser gelöst. Konzentration und Reinheit der RNA wurde mittels Agilent Bioanalyzer RNA-Chips auf einem Agilent 2100 Bioanalyzer, nach Angaben des Herstellers, bestimmt. Hierbei wurde RNA auf einem Gel, das sich auf einem Agilent Bioanalyzer RNA-Chip befand, in die charakteristischen 18 s und 28 s Banden aufgetrennt. Anhand der Bandenstruktur konnte durch einen internen Standard die Reinheit und Konzentration der eingesetzten RNA errechnet werden.

3.1.2. Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase; RTase) verwendet. Sie synthetisiert DNA-Kopien eines RNA-Moleküls, die als komplementäre DNA (cDNA) bezeichnet wird. Für die Synthese von cDNA-Molekülen

wurden Oligo(dT)-Primer verwendet. Sie hybridisieren mit dem poly-A-Ende der mRNA und dienen so für die RTase als Startbereich.

Für die reverse Transkription wurde pro Ansatz 1 µg gereinigte mRNA eingesetzt. Diese wurde zu einem Endvolumen von 19,5 µl mit RNase freiem Wasser verdünnt und im folgenden Reaktionsansatz (Reverse Transcription Set, Promega) eingesetzt:

Zusammensetzung des kompletten Reaktionsansatzes (pro Probe):

MgCl ₂	8 µl
10x Puffer	4 µl
dNTPs	4 µl
Oligo (dT)-Primer	2 µl
RNase Inhibitor	1 µl
<u>Reverse Transkriptase</u>	<u>1,5 µl</u>
	20,5 µl
<u>+RNA in RNase freiem Wasser</u>	<u>19,5 µl</u>
	40 µl

Der Ansatz wurde 15 Minuten bei 42° C und anschließend 5 Minuten bei 99° C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4° C gelagert. Zur Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente durch PCR wurden 5 µl der erhaltenen cDNA-Lösung eingesetzt.

3.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die spezifische Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die Reaktion wurde mit einem Volumen von 50 µl durchgeführt.

cDNA	5 µl
PCR Puffer, 10x conc. (Roche)	5 µl
5´Primer	5 µl
3´Primer	5 µl
Desoxynucleotidmischung (Roche)	1 µl
Taq DNA Polymerase (Roche)	1 µl
<u>Wasser</u>	<u>28 µl</u>
	50 µl

Nach einem Denaturierungsschritt von 5 Minuten bei 94° C wurden 35 Zyklen des nachfolgenden Reaktions-Schemas angewandt:

Denaturierung:	94° C; 1 Minute
Primerannealing:	60° C; 1 Minute
Elongation:	72° C; 1 Minute

Nach einer abschließenden Elongation bei 72° C für 7 Minuten wurden die amplifizierten PCR-Fragmente auf einem Agarosegel analysiert.

Oligonukleotid	Annealing-Temperatur
mTNF	62° C
β-Aktin	58,5° C

3.1.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge erfolgte im Agarosegel, wobei die Agarosekonzentration 1 % (w/v) betrug. Dazu wurde Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, mit Ethidiumbromidstammlösung im Verhältnis 1:10⁴ versetzt und in die Gelapparatur gegossen. Nach dem Abkühlen wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit Laufpuffer im Verhältnis 1:5 vermischt, in die vorbereiteten Geltaschen pipettiert und durch Anlegen einer elektrischen Spannung (5-10 V/cm) aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragment-Länge wurde zusätzlich ein entsprechender DNA-Standard (DNA-Molekulargewichtsstandard XIV) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente auf einem UV-Schirm bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und photographiert.

3.2. Proteinchemische Methoden

3.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht in SDS-Polyacrylamid-Gelen, die aus Sammel- und Trenngel bestanden, aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese wurde bei 0,8 mA/cm² durchgeführt. Anschließend wurde das Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

Sammelgel (3 %):	Acrylamid-Stammlösung (30 %)	0,85 ml
	Sammelgel-Trispuffer (pH 6.8)	1,5 ml
	H ₂ O	3,75 ml
	SDS (10 %)	60 µl
	APS (10 %)	50 µl
	TEMED	5 µl
Trenngel (15 %):	Acrylamid-Stammlösung (30 %)	8,13 ml
	Trenngel-Trispuffer (pH 8.8)	3,75 ml
	H ₂ O	3,13 ml
	SDS (10 %)	150 µl
	APS (10 %)	100 µl
	TEMED	10 µl

3.2.2. Coomassie-Färbung

Zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen oder auf Nitrozellulosemembranen wurde eine Färbung mit Coomassie-Blau durchgeführt. Dazu wurden Gele oder Membranen zunächst für 5 bis 10 Minuten in Färbelösung (0,25 % Coomassie Blue R250/L, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure) gelegt und anschließend in Entfärbelösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure) gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

3.2.3. Western Blot

Zur Detektion der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels Western-Blot wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Western Blot; (Towbin, 1979)). Dazu wurden je drei Whatmanpapierstücke in Gelgröße in den Transferpuffern A (0.3 M Tris Base, pH 10,4; 20 % Methanol), B (25 mM Tris Base, pH 10,4; 20 % Methanol) und C (4 mM ϵ -Amino-n-Caprinsäure, pH 7,6; 20 % Methanol) getränkt. Zunächst wurden je drei Whatmanpapierstücke A und B auf die Anodenplatte der Blotapparatur positioniert. Die Nitrozellulosemembran wurde mit Methanol befeuchtet, in Puffer B gespült und auf die Whatmanpapierstücke B gelegt. Anschließend wurde das Gel aufgelegt, mit drei Lagen Whatmanpapier C bedeckt und die Apparatur mit der Kathodenplatte geschlossen. Der Proteintransfer erfolgte durch Anlegen einer elektrischen Spannung für 0,8 Stunden bei 1 mA/cm². Die auf die Nitrozellulosemembran geblotteten Proteine wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Diese wurden mit einem sekundären,

Meerrettichperoxidase (HRP)-markierten Antikörper nachgewiesen. In beiden Fällen wurde die Membran nach dem Proteintransfer in 0,1 % PBS-T mit 1 % (w/v) Magermilchpulver für 30 Minuten blockiert und anschließend für 1 Stunde mit den entsprechenden Antikörpern in der angegebenen Konzentration inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Membran mit PBS-T und einmaligem Waschen mit PBS wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper versetzt. Vor der Detektion wurde die Membran fünfmal mit PBS-T und mindestens einmal mit PBS gewaschen. Die Detektion des HRP-gekoppelten Antikörpers erfolgte mit dem ECL-Western-Blot-System (EnerGene). Die Nachweisreaktion beruht auf einer Chemolumineszenzreaktion, die durch die HRP-katalysierte Oxidation eines Substrats (Luminol) hervorgerufen wird. Diese Lichtemission kann anschließend auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm-ECL) sichtbar gemacht werden.

3.3. Zellbiologische Methoden

3.3.1. Zellkulturbedingungen

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sterilbank (Laminair Flow[®]) durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien L 929 und die aus Mäusen gewonnenen Peritonealzellen wurden in Kulturflaschen mit RPMI-Medium, das 10 % FCS und 50 µg/ml Gentamycin beinhaltet, bei 37° C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank (Cell Safe[®]) kultiviert. Falls nicht anders angegeben, wurde die Zellsuspension dreimal wöchentlich im Verhältnis 1:5 geteilt. Medienwechsel oder Waschschrte wurden ausgeführt, indem die Zellen in sterilen Falconröhrchen 5 Minuten bei 1000 bis 1200 rpm zentrifugiert und anschließend das Zellpellet im entsprechenden Medium resuspendiert wurde.

3.3.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen, die langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert werden sollten, wurden zunächst bei 1200 rpm pelletiert und in einer Konzentration von ca. 1×10^6 Zellen/ml in kaltem Einfriermedium (40 % RPMI 1640; 50 % FCS; 10 % Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Anschließend wurden Aliquots zu 1,8 ml in Kryoröhrchen gefüllt, bei -80° C tiefgefroren und nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff überführt. Sollten tiefgefrorene Zellen erneut in Kultur genommen werden, wurde die Zellsuspension aufgetaut, in wenig Medium gewaschen und in frisches Kulturmedium überführt.

3.3.3. Bestimmung der Lebendzellzahl

Sollten Zellen in einer definierten Zellzahl in die entsprechenden Kulturgefäße eingesät werden, wurde mittels Trypanblau-Ausschlußtest die Anzahl der lebenden Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu wurden 100 µl einer Zellsuspension 1:1 mit Trypanblaulösung versetzt. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zahl an lebenden Zellen, die sich nicht durch Trypanblaulösung anfärben ließen, mikroskopisch ermittelt. Die Zellkonzentration wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Anzahl der Zellen in 16 Kleinquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl} \times 10^4 / \text{ml}$$

3.3.4. Mycoplasmentest

In regelmäßigen Abständen wurden sämtliche Zelllinien mit Hilfe des Mycoplasma Detection Kits auf einen Mycoplasmenbefall hin untersucht.

3.3.5. Gewinnung und Kultur primärer Peritoneal- und Peritonealexsudatzellen (PEC)

Für die Gewinnung der Peritoneal- (PC) und Peritonealexsudatzellen (PEC) wurden NMRI Mäuse durch Genickbruch getötet, das Fell mit 70 % Ethanol angefeuchtet und nach einem Einschnitt im unteren Bauchbereich durch gegenläufiges Ziehen vom gesamten Rumpfbereich abgezogen. Zum Auswaschen der Peritonealzellen wurde in den Bauchraum der Tiere 10 ml eiskaltes Medium mit Hilfe einer Spritze injiziert. Danach wurde das Medium mit den darin befindlichen Zellen wieder aufgenommen und in 50 ml Falcon® Röhrchen überführt. Im Anschluss wurden die Zellen bei 800 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die als Pellet abgelagerten Zellen in 1ml frischem Medium resuspendiert und zur Zählung vorbereitet.

3.4. Biochemische Methoden

Um den Stickoxidgehalt (NO) in Mäusen zu bestimmen, wurde das Griess-Reagenz-System (Promega, Madison, USA) benützt. Zur Vorbereitung der Proben für die Griess-Reaktion, wurden die Seren der Tiere zuerst 15 Minuten bei 14000 g durch einen Filter der Größe 0,2 µm (Nanosep MF 0,2 µm, Pall GmbH, Dreieich) zentrifugiert, anschließend nochmals 15 Minuten bei 14000 g durch einen Filter (Nanosep 30K Omega, Pall GmbH, Dreieich), der nur Proteine durchlässt, die nicht größer als 10 kDa sind. Da NO sehr instabil ist und schnell zu Nitrat und Nitrit abgebaut wird und außerdem nur Nitrit bei der Azokopplung der Griess-Reaktion nachgewiesen wird, wurde aus dem nach der Filtration transparent gewordenen Serum alles Nitrat zu Nitrit reduziert. Dazu wurden 50 µl Serum mit folgendem Mastermix versetzt:

Nitratreduktase (Roche)	0,1 U/ml
NADPH (biomol)	500 µM
FAD (Sigma)	5 µM
<u>Wasser</u>	<u>8,2 µl</u>
	10 µl

Der Mastermix und die Proben wurden auf einer 96 well-Platte zusammenpipettiert und für 20 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges NADPH, welches mit der nachfolgenden Griess-Reaktion interferieren würde, durch Zugabe von 10 µl einer 140 U/ml Lactatdehydrogenase-Lösung (LDH) für 15 Minuten bei 37° C oxidiert. Danach wurde mit den Proben die Griess-Reaktion nach den Angaben des Herstellers (Promega, Madison, USA) durchgeführt und damit der Gehalt an NO bestimmt. Die Reaktion basiert auf einer Azokopplung zwischen Sulfanilamid und N-1-Napthylethylendiamin mit der Beteiligung von Nitrit, die im Photometer bei 540 nm beobachtet werden kann.

3.5. Immunologische Methoden

3.5.1. Allgemeines über ELISA

In einem ELISA wird das Antigen entweder direkt an eine Mikrotiterplatte gebunden und über einen Antikörper nachgewiesen oder man verfährt nach dem sogenannten „Sandwich“-Prinzip.

Die Mikrotiterplatte wird dazu mit einem „Fang-Antikörper“ beschichtet. Nach Inkubation mit der antigenhaltigen Probelösung wird das an den „Fang-Antikörper“ gebundene Antigen mit einem zweiten Antikörper, dem sog. Sekundärantikörper, nachgewiesen, wobei der Sekundärantikörper mit einem Enzym gekoppelt sein kann. Bei unmarkierten Sekundärantikörpern verwendet man einen dritten Antikörper, der den Sekundärantikörper erkennt und eine Enzymmarkierung trägt. Am häufigsten werden Antikörper mit den Enzymen Peroxidase (POX) oder alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt. Biotinylierte Antikörper werden mit einem Streptavidin-POX- oder Streptavidin-AP-Komplex nachgewiesen. Die Menge an gebundenem, Enzym-markierten Antikörper ist der Menge an gebundenem Antigen proportional und wird über den Umsatz eines geeigneten chromogenen Substrates photometrisch bestimmt.

3.5.2. ELISA zur Quantifizierung von mTNF, mL-6, mMIF und huMIF

Die Quantifizierung wurde mit den entsprechenden ELISA-Kits nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt (R&D Systems, Wiesbaden). Bei diesen ELISAs liegt das Sandwich-Prinzip zugrunde. Zur Messung wurde das zuvor gewonnene und bei -20° C gelagerte Serum (im Fall des huMIF Lithium-Heparin-Plasma) aufgetaut und in der erforderlichen Verdünnung verwendet. Zur Entwicklung der ELISAs wurde ABTS in ABTS-Puffer gelöst und die Absorption bei 405 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der zum ELISA-Reader zugehörigen SoftMax® Software.

3.5.3. Allgemeines zum Radioimmunoassay (RIA)

Das Prinzip des Radioimmunoassay basiert auf der Konkurrenz zwischen radioaktiv markiertem und nativem Antigen um eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen eines spezifischen Antikörpers. Je mehr natives Antigen in den Proben ist, desto weniger kann markiertes Antigen vom Antikörper gebunden werden. Nach einem Inkubationsschritt ist die Menge an markiertem Antigen-Antikörper-Komplex umgekehrt proportional der Menge an nativem Antigen in den zu bestimmenden Proben. Zur Abtrennung von Antikörper-gebundenem und freiem markiertem Antigen wird die Doppelantikörpermethode eingesetzt, wobei ein zweiter Antikörper im Überschuss zugegeben wird. Durch Zentrifugieren wird der gebildete 2.Antikörper-Antikörper-Antigen-Komplex abgetrennt, ungebundenes Antigen wird dekantiert und die Radioaktivität im Niederschlag gemessen.

3.5.4. RIA zur Quantifizierung von Corticosteron

Die Quantifizierung wurde mit dem entsprechenden RIA-Kit nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt (IBL, Hamburg). Bei diesem Test wurde Jod-125 markiertes Corticosteron als radioaktives Antigen für die Konkurrenzreaktion zu nativem Corticosteron verwendet. Zur Messung wurde das zuvor gewonnene und bei -20° C gelagerte Serum aufgetaut und in der erforderlichen Verdünnung verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels des Szintillationszählers TR Packard 10600 Tri-Carb (PerkinElmer, Boston, USA).

3.6. Bioaktivitätstests

3.6.1. TNF-Zytotoxizitäts-Assay

Um einen konfluenten Zellrasen zu erhalten, wurden $2,5 \times 10^4$ L929-Zellen pro Kultur auf eine 96-Well-Platte ausgesät und über Nacht inkubiert (Volumen 100 µl). Das Medium wurde abgesaugt und rekombinantes humanes TNF in einer log₂-Verdünnungsreihe titriert, wobei das erste Well eine empirisch ermittelte absolut toxische Menge und das letzte Well kein TNF enthielt (100 % und 0 % Wert). Die Randlöcher der Platte enthielten keine Zellen, wurden jedoch ebenso wie die anderen behandelt (Mediumkontrolle). Zu den 100 µl Medium im Well wurden anschließend 100 µl Actinomycin D-haltiges Medium (4 µg/ml) zugegeben, um die Proteinbiosynthese zu blockieren. Die Platte wurde 24 Stunden inkubiert. Zur Bestimmung der Lebend-Zellzahl wurden dem Kulturmedium 10 µl der MTT-Stammlösung zugesetzt und für weitere 4 Stunden inkubiert. MTT wird von stoffwechselaktiven Zellen aufgenommen und in den Mitochondrien oxidativ umgesetzt, was zur Bildung eines blauen Farbstoffs führt, dessen Entstehung sich somit proportional zur Viabilität verhält. Der Farbstoff bildet Kristalle, die durch Zugabe von 70 µl einer 20 %-igen SDS-Lösung in Lösung gebracht wird. Die Zugabe von SDS stoppte gleichzeitig die Reaktion, da auch die Zellen lysiert wurden. Die optische Dichte des Reaktionsprodukts wurde bei 540 nm vermessen. Die Viabilität wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Viabilität [\%]} = 100\% \times (A_{\text{treated}} - A_{\text{medium}}) / (A_{\text{untreated}} - A_{\text{medium}})$$

3.6.2. Dopachrom-Tautomerase-Assay

Eine biologische Eigenschaft von MIF ist die Tautomerisierung von D-Dopachrom- und L-Dopachrom-methylestern zu den jeweiligen Indol-Derivaten (Rosengren, 1996). Diese Funktion wird für die Überprüfung der Bioaktivität von rekombinant hergestelltem MIF genutzt. Dazu wurde eine frische Lösung von L-Dopachrom-methylester durch die Oxidation von L-3,4-Dihydroxyphenylalanin-methylester (4 mM) mit Natriumperjodat (8 mM) für 5 Minuten bei Raumtemperatur hergestellt (Dios, 2002). Die L-Dopachrom-methylester-Lösung wurde sofort nach der Herstellung auf Eis gelagert und 100 µl davon wurden in einer Plastikküvette mit 800 µl eines 25 mM Kaliumphosphat-Puffers verdünnt. 30 Sekunden danach wurden 100 µl einer 100 nM MIF-Lösung dazupipettiert und das Abnehmen der Absorption bei Raumtemperatur und einer Wellenlänge von 475 nm für 4 Minuten festgestellt. Die Messung erfolgte mit Hilfe des Photometers Ultrospec II (Amersham, Buckinghamshire, England). Das Abnehmen der Absorption lässt sich auch optisch, durch das Verblassen der orange-roten L-Dopachrom-methylester-Lösung, beobachten.

3.7. Tierexperimentelle Methoden

Alle operativen Eingriffe sind unter keimarmen Bedingungen durchgeführt worden. Um Infektionen mit exogenen Erregern zu vermeiden, wurden sämtliche Geräte sowie die Arbeitsflächen sorgfältig gereinigt und mit 70 %-igem Isopropanol desinfiziert.

3.7.1. Haltung der Tiere

Alle verwendeten Tiere waren entsprechend den Haltungsvorschriften untergebracht, hatten einen 12 Stunden Hell-Dunkel Rhythmus und erhielten die speziesspezifische Standarddiät und Leitungswasser ad libitum.

3.7.2. Induktion einer experimentellen septischen Peritonitis mittels zökaler Ligation und Punktion (CLP)

Vor der Induktion einer experimentellen septischen Peritonitis mittels CLP wurde den Tieren intraperitoneal 10 µl/g Maus einer sterilen Lösung aus 15 % Ketamin und 8 % Xylazin in PBS injiziert, um sie zu narkotisieren. Nach Feststellung der vollständigen

Anästhesie durch Drucktest an der Hinterpfote wurden die Tiere auf den Rücken gelegt, der untere ventrale Bereich des Tieres mit Skinman® soft Händedesinfektionsmittel benetzt und das Fell mittels eines ca. 1cm langen Schnittes entlang der medianen Ebene aufgeschnitten.

Die Laparotomie erfolgte durch einen Schnitt entlang der Linea alba. Anschließend wurde das Zökum vorsichtig aus der Öffnung gezogen und auf ein zurechtgeschnittenes und desinfiziertes Stück Parafilm® gelegt.

Die Ligation des distalen Teils des Blinddarms wurde mit einem Baumwollfaden der Stärke 0,12 mm durchgeführt. Dabei wurden, je nach gewünschter Letalität, 30 % - 50 % des Zökums mit einem doppelten Knoten abgebunden und die überstehenden Enden des Fadens entfernt.

Die nachfolgende Perforation erfolgte durch einen Einstich in den abgebundenen Teil des Blinddarms mit einer sterilen Kanüle von 0,4 mm Durchmesser.

Nach dem Rücklegen des Zökums in das Peritoneum wurden Bauchdecke und Fell gemeinsam durch 3 Wundklammern (Tierärztebedarf Lehnecke, Schortens) verschlossen, die Mäuse in frisch eingestreute Käfige gelegt und deren Zustand bis zum Erwachen ständig kontrolliert.

3.7.3. Induktion einer Primär- und Sekundärinfektion

Primär- und Sekundärinfektionen wurden bei den 3 verwendeten Keimen folgendermaßen induziert:

- *Pseudomonas aeruginosa*, suspendiert in 10 µl LB-Medium, intranasal in narkotisierte Tiere mit einer 10 µl-Pipette appliziert
- *Salmonella typhimurium*, suspendiert in 500 µl LB-Medium, intraperitoneal injiziert
- *Listeria monocytogenes*, suspendiert in 500 µl 0,9 %-iger NaCl-Lösung, intraperitoneal injiziert

3.7.4. Stimulierung zur Bestimmung der Produktionsfähigkeit von Zytokinen

Die Stimulierung erfolgte durch intravenöse retro-orbitale Injektion von 1 µg LPS in 200 µl sterilem PBS. Vor der Applikation des LPS mit 1 ml Spritzen und 0,4 mm Kanülen wurden die Tiere mit Äther anästhesiert. 90 Minuten nach der Stimulierung wurde den Mäusen Blut abgenommen, um damit die Zytokinkonzentrationen zu messen.

3.7.5. Serumgewinnung aus Mausblut

Blut aus Mäusen wurde durch retro-orbitales Bluten unter Äther-Anästhesie gewonnen. Das Blut wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4° C im Kühlschrank stehen gelassen, um vollständige Gerinnung zu gewährleisten. Am darauf folgenden Tag wurde der Blutkuchen für 5 Minuten bei 10000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand, das Serum, wurde abgenommen und in Eppendorf-Violen bei -20° C gelagert.

3.8. Mikrobiologische Methoden

3.8.1. Kultivierung und Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) von *Salmonella typhimurium*

Für sämtliche Experimente mit *S.tm.* wurden Aliquots von 1×10^9 Bakterien suspendiert in 1 ml LB Medium unter Zusatz von 25 % Glycerol verwendet, die bei -80° C gelagert worden waren.

Nach dem Auftauen wurden die Keime in 15 ml Falcon®-Röhrchen mit flüssigem LB-Medium, das 100 µg/ml Ampicillin enthielt, überführt und für 24 Stunden bei 37° C auf einer Rüttelplatte mit einer Geschwindigkeit von 200 rpm kultiviert. Durch das Hinzufügen von Ampicillin wurde sichergestellt, dass nur *S.tm.* sich vermehren würde, da der verwendete Stamm gegen dieses Antibiotikum resistent ist. Einen Tag später wurde die Bakteriensuspension in reines LB-Medium überimpft, um einen Einfluss von Ampicillin auf die Tierexperimente zu verhindern, und für weitere 24 Stunden bei denselben Bedingungen inkubiert. Die Kultur erfolgte in fest verschlossenen 10 ml Falcon®-Röhrchen und somit unter weitgehend anaeroben Bedingungen.

Nach photometrischer Bestimmung der ungefähren Zellzahl bei 560 nm wurde in Verdünnungsreihen die für die Experimente erforderliche Konzentration hergestellt. Von den Verdünnungen, die nach photometrischer Messung einen Wert von 10^3 bzw. 10^2 KBE/ml enthielten, wurden jeweils 3 Platten XLD-Agar mit 100 µl Bakteriensuspension beimpft und im Brutschrank für 24 Stunden bei 37° C inkubiert, um die exakte Anzahl koloniebildender Einheiten zu bekommen. Durch Zählung der schwarzen Kolonien auf den roten XLD-Agarplatten, die charakteristische Färbung dient gleichzeitig als Identifikationsmerkmal für *Salmonellen*, konnte die genaue Konzentration der Bakterien in der Suspension bestimmt werden.

3.8.2. Kultivierung und Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) von *Pseudomonas aeruginosa*

Für die Kultivierung von *P.a.* wurden die gleichen Bedingungen gewählt wie bei *S.tm.*, nur dass der Inkubationsschritt mit ampicillinhaltigem LB Medium entfiel, da der verwendete Stamm nicht resistent gegen dieses Antibiotikum ist.

Die exakte Bestimmung der Bakterienzahl erfolgte auf Cetrimid-Agar-Platten mit der gleichen Vorgangsweise wie bei *S.tm.* Zur Identifikation von *P.a.* diente ein positiver Befund im DrySlide®-Oxidase-Test. Dabei wird durch das intrazelluläre Cytochromoxidase-System der *P.a.* Cytochrom C oxidiert, das wiederum N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin-Dihydrochlorid, welches im reduzierten Zustand farblos ist, zu einem violetten Farbstoff oxidiert.

3.8.3. Kultivierung und Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) von *Listeria monocytogenes*

Für sämtliche Experimente mit *L.m.* wurden Aliquots verwendet, die auf CRYOBANK™ Stammhaltungs-Kulturmedien für Mikroorganismen bei -80° C gelagert wurden. Die kleinen torsoförmigen Kulturmedien wurden auf Columbia-Agar mit 5 % Frischblut vom Schaf verbracht, über den Nährboden gerollt und 24 Stunden bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Die nach einem Tag gewachsenen Kolonien wurden mit Hilfe 0,9 %-iger NaCl-Lösung suspendiert und so verdünnt, dass in einem ABT Nephelometer ein Wert von 0,5 nach dem MacFarland Index gemessen wurde. Dieser Wert entspricht einer Konzentration von 10^8 KBE/ml.

Daraus wurde in Verdünnungsreihen die für die Experimente erforderliche Konzentration hergestellt. Von den Verdünnungen, die nach nephelometrischer Messung 10^3 bzw. 10^2

KBE/ml enthielten, wurden jeweils 3 Frischblut-Agar-Platten mit 100 µl Suspension beimpft und im Brutschrank 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die exakte Anzahl koloniebildender Einheiten wurde durch Zählung der Bakterien auf der Platte bestimmt. Mittels β -Hämolyse der Bakterien auf den Frischblut-Agar-Platten erfolgte die Identifikation von *L.m.*

3.9. Design der Sepsisstudie

Das „Unicenter Sepsis Survey of Regensburg“ wurde beauftragt, klinische Daten und Blutproben von Patienten die an SIRS, Sepsis und Sepsis mit Organdysfunktionen (Schwere Sepsis/septischer Schock) leiden, zu sammeln. Die Studie wurde in 3 Intensivstationen des Klinikums Regensburg durchgeführt. Patienten wurden in die Studie aufgenommen, wenn sie Anzeichen für eine schwere Sepsiserkrankung zeigten und wenigstens 3 SIRS-Kriterien (Bone, 1992), wie zum Beispiel einen Infektionsherd und mindestens eine Organdysfunktion, weswegen eine Behandlung auf der Intensivstation nötig war, erfüllten. Die Patienten, oder falls diese nicht mehr ansprechbar waren, ihre Angehörigen, wurden über die Studie informiert und nur mit ihrer Zustimmung wurden die Blutproben untersucht. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität geprüft und genehmigt.

Das Patientenkollektiv von 178 Personen wurde in 2 Gruppen unterteilt. Die eine Gruppe beinhaltete 86 Patienten, die nach der Verlegung auf die Intensivstation Cortisolinfusionen erhielten, die andere Gruppe wurde nicht mit Glucocorticoiden therapiert. Grundcharakteristika der Patienten, frühere Erkrankungen oder Therapien, die Lage des Infektionsherds, Routine-Laborparameter, Blutgas-Untersuchungen, hämodynamische Parameter und Parameter der mechanischen Ventilation, wurden gesammelt. Aufgrund dieser Daten und der klinischen Untersuchung wurde der APACHE II Wert (Knaus, 1985) ermittelt. Die Therapie der Sepsispatienten, welche die Applikation von Medikamenten wie Antibiotika, Sedativa, Analgetika, Diuretika, Hydrocortison sowie Blutprodukten beinhaltete, wurde in einer zentralen Datenbank gespeichert. Die Patienten wurden bis zum Tag 30 beobachtet. Ein früher Tod der Patienten wurde als ein Ereignis definiert, das innerhalb der ersten 14 Tage nach der Verlegung auf die Intensivstation erfolgte.

Die Blutproben wurden an den Tagen 1, 4 und 11 nach der Einlieferung auf die Intensivstation genommen. Für die Untersuchung der MIF-Konzentration wurden Lithium-Heparin-Proben angefertigt und bei -20° C gelagert. Die Proben wurden für die

Bestimmung der MIF-Plasmaspiegel aufgetaut, 1:50 mit PBS verdünnt und anschließend in einen ELISA (R&D Systems, Wiesbaden) eingesetzt.

3.10. Statistik

Die Ergebnisse der Tierexperimente sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) angegeben. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurden signifikante Unterschiede bei Daten von ELISA, TNF-Bioaktivitätstest, RIA und NO-Test bestimmt. Um statistisch signifikante Unterschiede aus den Daten der Überlebensexperimente zu erkennen, wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven, durch Verwendung des Log-Rank-Tests, miteinander verglichen.

In der Sepsisstudie wurden die MIF-Werte als Box Plots dargestellt. Statistische Analysen wurden mit dem Programm SPSS Version 10.0 durchgeführt (SPSS, Chicago, IL). Die verschiedenen Zeitpunkte der MIF-Konzentrationsbestimmung (Zeitpunkt 1, 4, und 11) wurden mit dem Friedman-Test analysiert. Der nicht-parametrische Korrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) wurde benutzt, um herauszufinden, ob zwischen MIF und den anderen Variablen eine Korrelation besteht. Die Gesamtüberlebenskurven wurden mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet, indem die Signifikanz mit dem zweiseitigen Log-Rank-Test ermittelt wurde. Das Gesamtüberleben wurde ab dem Zeitpunkt der Einlieferung auf die Intensivstation gemessen, und der mediane MIF-Wert vom Tag 1 wurde als Schwellenwert gewählt, um die metrischen Variablen zu kategorisieren. Hazard Ratios und 95 % Konfidenzintervall wurden mit einem Cox-Regressions-Modell erstellt.

4. Ergebnisse

4.1. Überprüfung der Reinheit und der biologischen Aktivität des rekombinanten humanen MIF (rhMIF)

4.1.1. Reinheit und Molekulargewicht des rhMIF

Das rhMIF wurde im Plasmid pRS5a in *Escherichia coli* Bakterien exprimiert und gereinigt. Durch eine Kooperation mit der Firma Novartis, Wien, erhielt ich das fertig aufgereinigte Protein. Als Vergleich für das Molekulargewicht diente rhMIF aus dem Labor von Thierry Calandra in Lausanne, das schon getestet und dessen biochemischen Eigenschaften publiziert waren (Bernhagen, 1994). Molekulargewicht und Reinheit des rhMIF wurden durch SDS-Gel-Chromatographie, Western Blot und Coomassie-Färbung geprüft (Abb. 4).

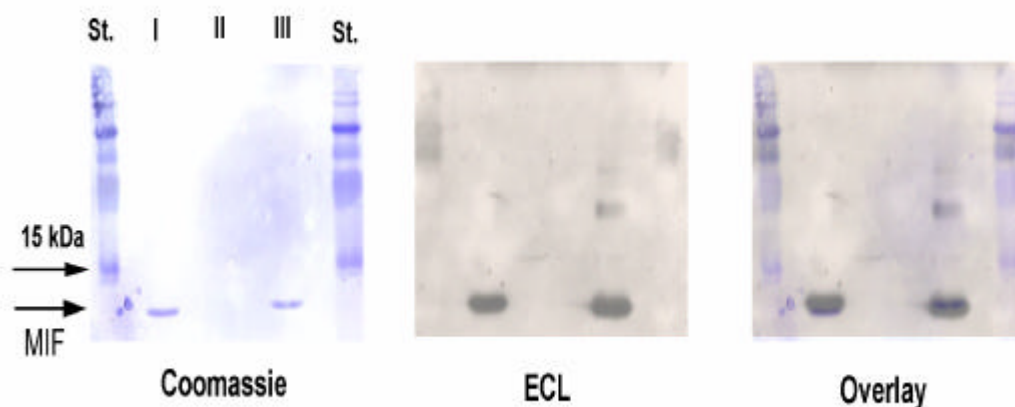


Abbildung 4:

Überprüfung der Reinheit und des Molekulargewichts des gereinigten rhMIF.

Coomassie-Färbung und Western Blot (ECL): Auftrennung erfolgte unter reduzierenden Bedingungen. Beim Western Blot wurde als Erstantikörper Hase-anti-Maus MIF (3 µg/ml) und als Sekundärantikörper Ziege-anti-Hase IgG POX, (1 µg/ml) verwendet. St.: Rainbow®-Marker als Standard. Spur I: rhMIF. Spur II: Negativkontrolle (Wasser). Spur III: Positivkontrolle (rhMIF von Calandra).

Sowohl in der Coomassie-Färbung als auch im Western Blot war die rhMIF spezifische Bande bei 12,5 kDa und damit auf der gleichen Höhe wie die entsprechende Bande in der

Kontrolle. Dies zeigte, dass das rhMIF nicht verunreinigt war und dass das klonierte Protein die richtige Größe hatte.

4.1.2. Bioaktivität des rhMIF

Die biologische Aktivität des rhMIF wurde in einem *in vitro* Experiment getestet. Die enzymatische Aktivität ist eine Möglichkeit, wie MIF seine Wirkungen im Organismus entfaltet. So setzt MIF als Katalysator in einer enzymatischen Reaktion Dopachrom in 5,6-Dihydroxyindol-2-carboxylsäure (DHICA) um. Dabei kann man eine Abnahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 475 nm beobachten. Diese Umsetzung funktioniert nur mit nicht denaturiertem MIF und ist deswegen ein Test für dessen Bioaktivität. Als Kontrollen dienten Hitze-inaktiviertes MIF und Wasser (Abb. 5).

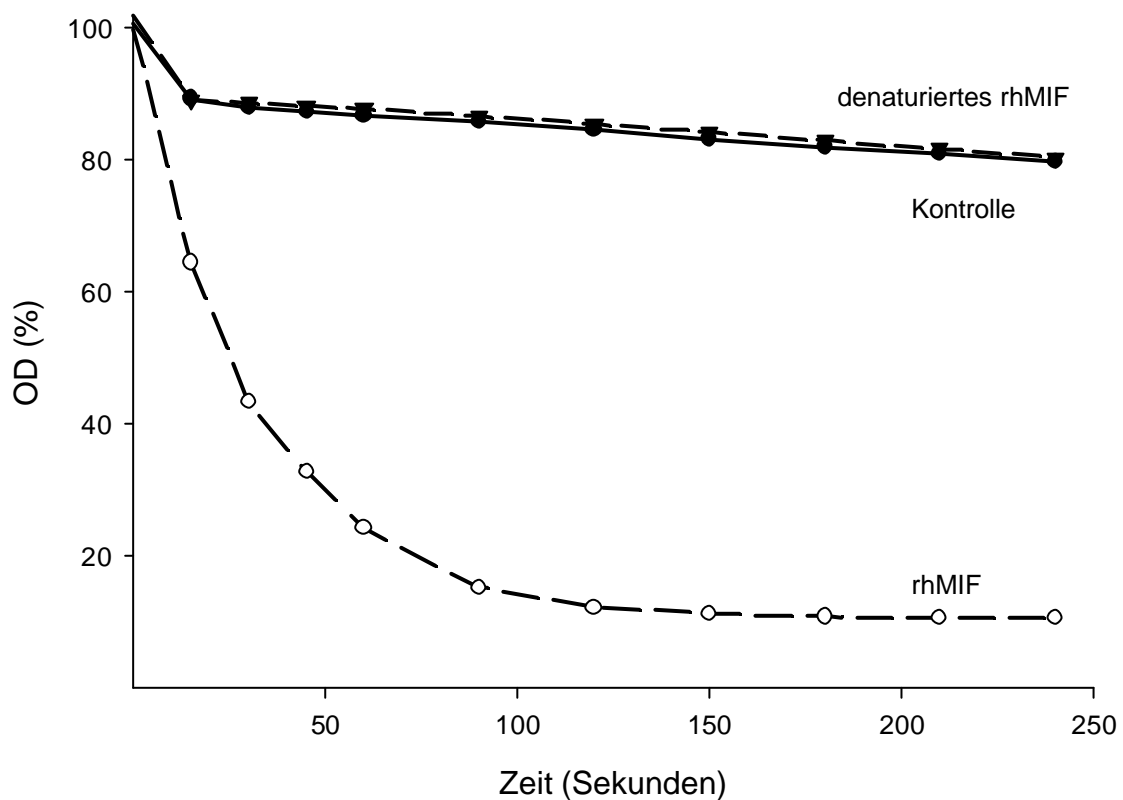


Abbildung 5:
Überprüfung der biologischen Aktivität des rhMIF.

100 µl einer 2 mM Lösung von L-Dopachrom wurden mit 800 µl Natriumphosphatpuffer verdünnt und zum Zeitpunkt 0 und als 100 % Wert im Photometer bei 475 nm vermessen. Anschließend wurden entweder 100 µl Wasser(?), rhMIF(?) oder Hitze-inaktiviertes rhMIF (?) (jeweils 100 nM Endkonzentration) hinzugefügt und die Abnahme der Absorption zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen.

Nur das native rhMIF zeigte einen starken Abfall der Absorption auf unter 20 % des Ausgangswertes innerhalb von 100 Sekunden. Das denaturierte rhMIF hingegen verhielt sich wie die Wasserkontrolle. Beide zeigten nur zu Beginn eine Reduktion der Absorption von ca. 10 %, was mit der Verdünnung der L-Dopachromlösung zu erklären ist, und blieben danach konstant. Dies bewies, dass das rhMIF der Firma Novartis aus Wien als Tautomerase biologisch aktiv war.

4.2. Etablierung von Infektionsmodellen

Mit Hilfe von bakteriellen Infektionsmodellen sollten die immunmodulatorischen Eigenschaften von MIF untersucht werden. Dafür wurden zwei verschiedene Bakterienstämme ausgewählt, um ein breiteres Spektrum an Infektionen zu untersuchen. Die zwei Stämme waren: *Pseudomonas aeruginosa* (*P.a.*), ein gramnegativer, extrazellulärer Keim und typischer Erreger bei nosokomialen Infektionen, und *Salmonella typhimurium* (*S.tm.*), ein gramnegatives, fakultativ intrazelluläres und mauspathogenes Bakterium.

Von diesen beiden Bakterienstämmen musste für die Tiere die gerade noch subletale Dosis gefunden werden, um die Wirkung von MIF bei den entsprechenden Infektionen zu untersuchen. Daher wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Keimen, die den Mäusen appliziert wurden, Überlebensexperimente durchgeführt (Abb. 6).

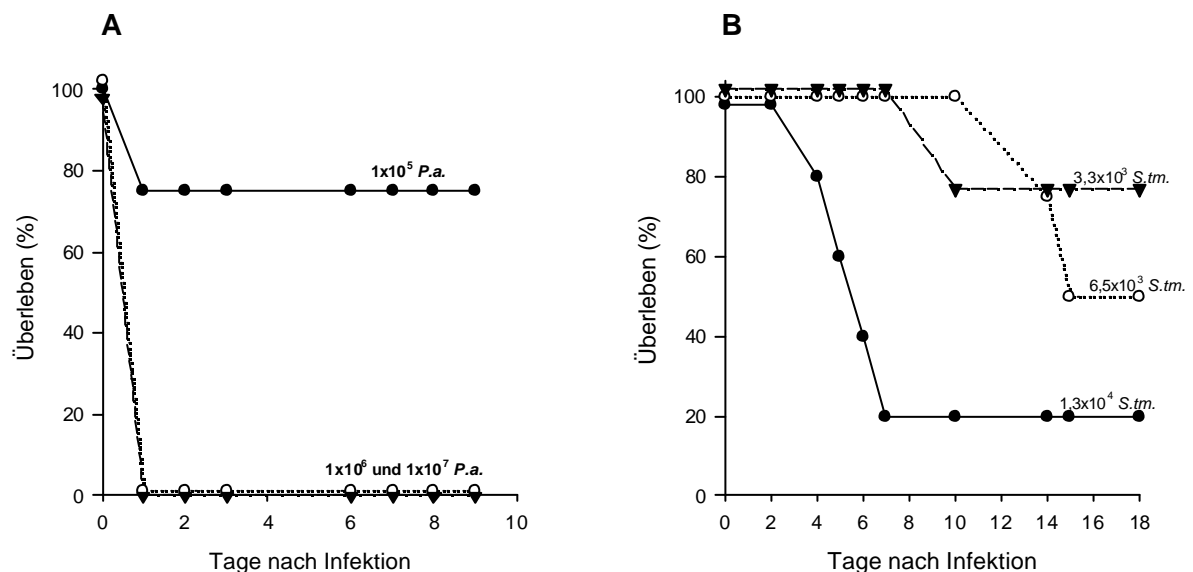


Abbildung 6:

Herauffinden der subletalen Mengen an Bakterien.

Die Mäuse wurden mit **A** 1x10⁷ (?), 1x10⁶ (?), und 1x10⁵ (?) (jeweils n = 4) (P = 0,0041) *P.a.* i.n. und **B** 1,3x10⁴ (?), 6,5x10³ (?), und 3,3x10³ (?) (bei der Konzentration 1,3x10⁴ n = 5, bei den anderen beiden Gruppen n = 4) (P = 0,0707) *S.tm.* i.p. infiziert.

Die Infektion mit *P.a.* wurde intranasal durchgeführt, da dies den natürlichen Infektionsweg darstellt. Alle Tiere starben bereits einen Tag nach der Infektion mit 1×10^7 , oder 1×10^6 *P.a.* (Abb. 6 A). Dagegen überlebten 85 % eine Dosis von 1×10^5 über den Verlauf des Experiments von 10 Tagen.

Die *Salmonellen* wurden intraperitoneal appliziert, da eine genau dosierte Abgabe über die Nahrung, den natürlichen Infektionsweg, unmöglich war. Hier überlebten nur 20 % der Mäuse eine Dosis von $1,3 \times 10^4$, 50 % eine Anzahl von $6,5 \times 10^3$ und 80 % die Menge von $3,3 \times 10^3$ *S.tm* (Abb. 6 B). Auffällig war auch, dass die Tiere langsamer starben als bei einer Infektion mit *P.a.*

4.3. Die Rolle von MIF bei gesunden Mäusen

4.3.1. Einfluss von MIF auf Entzündungsparameter

Um herauszufinden, inwieweit MIF seine proinflammatorischen Eigenschaften in gesunden Mäusen entfaltet, wurde Mäusen rhMIF injiziert und anschließend die Veränderung von wichtigen Entzündungsparametern gemessen (Abb. 7).

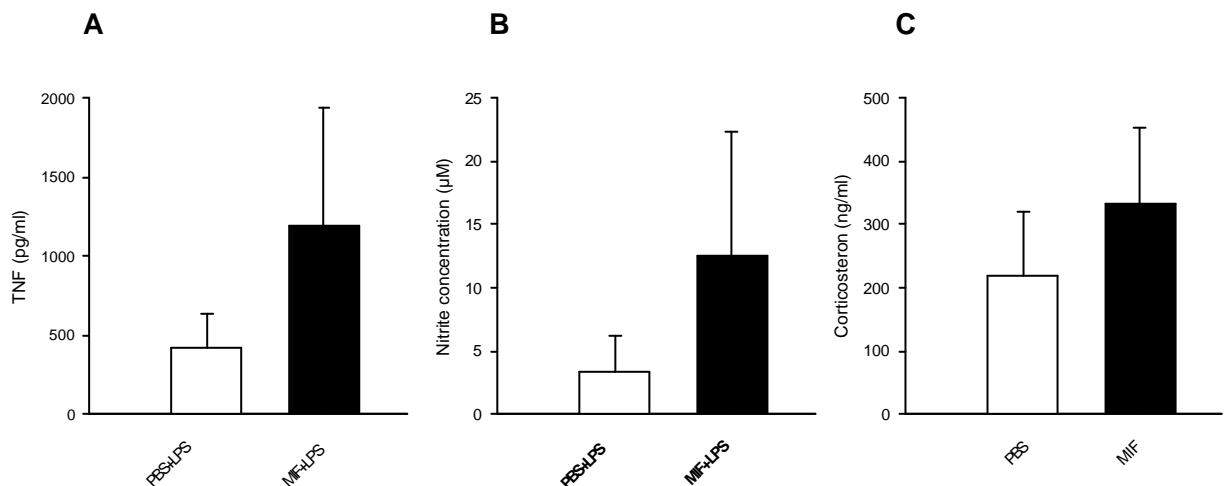


Abbildung 7:
Einfluss von MIF auf Entzündungsparameter.

Den Mäusen wurden 20 µg rhMIF oder 100 µl PBS intraperitoneal injiziert. 6 Stunden später wurden die Tiere entweder mit 1 µg LPS intravenös stimuliert und 90 Minuten später geblutet, um die Serumkonzentrationen für **A** TNF (jeweils n = 5) ($P = 0,115$) und **B** Nitrit (jeweils n = 5) ($P = 0,056$) zu erhalten, oder sofort geblutet **C**, um den Corticosterongehalt (jeweils n = 10) ($P = 0,023$) zu bestimmen.

Die Gabe von MIF erhöhte die Serumkonzentration der Entzündungsmarker TNF (Abb. 7 A) und Stickoxid (Abb. 7 B). Bei beiden Parametern wurde mit LPS vor der Konzentrationsbestimmung stimuliert, da ansonsten der Gehalt unterhalb der Detektionsgrenze des Bestimmungstests liegen würde.

Gleichzeitig kam es zu einer erhöhten Sezernierung des antiinflammatorischen Glucocorticoids Corticosteron (Abb. 7 C). Der Unterschied war im Gegensatz zu den beiden anderen Parametern signifikant ($P = 0,023$).

Zusammenfassend kann man sagen, dass MIF einen Anstieg von proinflammatorischen Faktoren sowie von gegenregulatorisch wirkendem antiinflammatorischen Corticosteron erzeugt. Diese Erhöhung war aber bei den meisten Parametern nicht sehr ausgeprägt und damit auch nicht signifikant.

4.3.2. Einfluss der Neutralisation von MIF auf TNF-Serumspiegel

Es sollte geklärt werden, ob die Neutralisation von MIF eine Veränderung in der gesunden Maus hervorruft. Dies wurde durch die Gabe von 100 µg polyklonaler Antikörper gegen murines MIF und der anschließenden Untersuchung der Serumspiegel von TNF getestet.

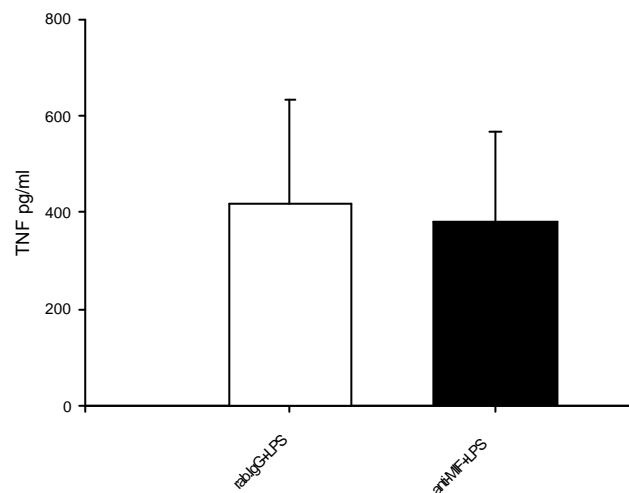


Abbildung 8:

Neutralisation von MIF hat keinen Einfluß auf die TNF-Serumspiegel.

Den Mäusen wurden 100 µg Antikörper gegen MIF ($n = 4$) oder 100 µg rab.IgG ($n = 5$) intraperitoneal injiziert. 6 Stunden später wurden die Tiere mit 1 µg LPS intravenös stimuliert und 90 Minuten später geblutet, um die Serumkonzentrationen für TNF mittels ELISA zu bestimmen ($P = 1,00$).

Die mit Antikörpern gegen MIF und mit LPS stimulierten Tiere zeigten keinen Unterschied in der Konzentration des proinflammatorischen Zytokins im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit einem Kontrollantikörper behandelt wurde. Da die Konzentration von TNF, einem der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine, durch die Neutralisation von MIF in keinem Experiment beeinflusst wurde, wurden keine anderen Entzündungsparameter untersucht.

4.3.3. Neutralisation von MIF vor einer subletalen Infektion

Die Neutralisation von MIF schützt vor dem letalen endotoxischen und septischen Schock (Bernhagen, 1993, Calandra, 2000). Andererseits können MIF-defiziente Mäuse eine Infektion mit *Salmonella typhimurium* nicht beherrschen (Koebernick, 2002). Um zu testen, inwieweit die Neutralisation von MIF subletale Infektionen beeinflusst, wurden gesunden Mäusen vor der Infektion mit den Bakterien Antikörper gegen murines MIF appliziert (Abb. 9).

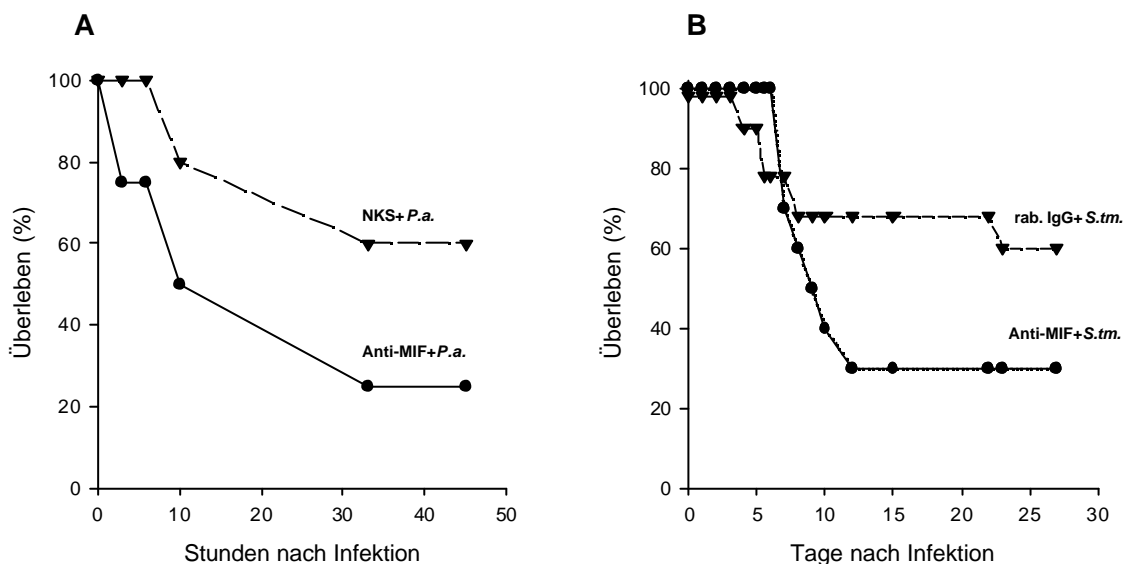


Abbildung 9:

Die Neutralisation von MIF schadet bei subletalen Infektionen.

Die Mäuse wurden mit 100 µg Hase-anti-Maus MIF Antikörper (?) **A** 1 Stunde vor der Infektion mit 1×10^5 *P.a.* (n = 4) (P = 0,2558) intranasal, oder **B** 6 Stunden vor der Infektion mit $6,75 \times 10^3$ *S.tm.* (n = 10) (P = 0,2511) intraperitoneal behandelt. Als Kontrollen wurden anstatt der Antikörper gegen MIF **A** 100 µg gereinigtes Normalkaninchenserum (NKS) (?) (n = 5) und **B** 100 µg gereinigtes Kaninchen-Immunglobulin G (rab. IgG) (?) (n = 10) injiziert.

Bei subletalen Infektionen schadete die Neutralisation von MIF. Dies konnte man sowohl bei der Belastung mit *P.a.* (Abb. 9 A), als auch mit *S.tm.* (Abb. 9 B) beobachten.

Überlebten in den beiden Kontrollgruppen noch 60 % der Mäuse, sind es bei der

Vorbehandlung mit Antikörpern gegen MIF nur noch 30 %. Auch hier konnte man wieder deutlich erkennen, dass das Absterben der Tiere durch *S.tm.* wesentlich langsamer geschieht als durch *P.a.*

4.3.4. Applikation von MIF vor einer subletalen *S.tm.*-Infektion

Da die Neutralisation von MIF vor einer subletalen Infektion schädlich war, sollte getestet werden, ob eine Vorbehandlung mit exogenem MIF die Überlebensaussichten der Tiere erhöhen kann (Abb. 10).

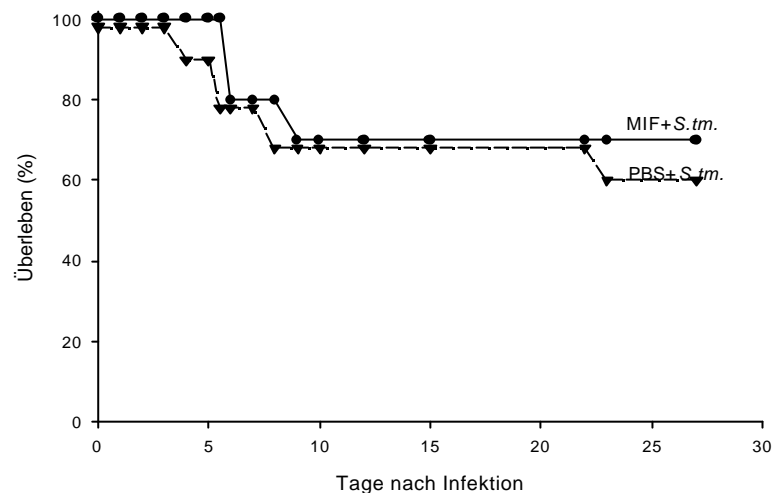


Abbildung 10:

Exogenes MIF hat keinen Einfluss auf subletale Infektionen.

Die Mäuse wurden mit 20 µg rhMIF (?) oder 100 µl PBS (?) i.p. behandelt (jeweils n = 10) (P = 0,3127). 6 Stunden später wurden sie mit $6,75 \times 10^3$ *S.tm.* i.p. belastet.

Die Gabe von 20 µg exogenem MIF bringt keinen Überlebensvorteil bei der subletalen *S.tm.* Infektion. Beide Kurven verlaufen fast parallel (Abb. 10). Der Versuch wurde nur mit *S.tm.* durchgeführt.

4.4. Untersuchung des Immunstatus nach CLP

Um eine Sepsis-bedingte Immunparalyse zu simulieren, wurde an Mäusen das etablierte Modell der zökalen Ligation und Punktion (CLP) durchgeführt (Echtenacher, 1990). Dabei wurde den narkotisierten Tieren ein Stück des Blinddarms abgebunden und das abgebundene Stück mit einer Kanüle perforiert. Es traten Bakterien aus dem Darm in das Peritoneum über und ein Abszess und eine systemische Entzündung entstanden.

Für die Modulation des Immunsystems war es wichtig, die genauen zeitlichen Veränderungen des Immunstatus der Tiere nach CLP zu messen.

4.4.1. Kinetik von Immunmodulatoren nach CLP

Zur Untersuchung der systemischen Änderung von Immunmodulatoren nach CLP wurde bei den Mäusen eine subletale CLP, mit einer Ligation von 30 % und einer Perforation von 0,4 mm, durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten geblutet und daraus das Serum gewonnen. Aus dem Serum wurden die immunmodulatorischen Parameter TNF, IL-6, Corticosteron (das murine Äquivalent zum humanen Cortisol und damit Hauptglucocorticoid (Shimizu, 1983)) und MIF bestimmt (Abb. 11).

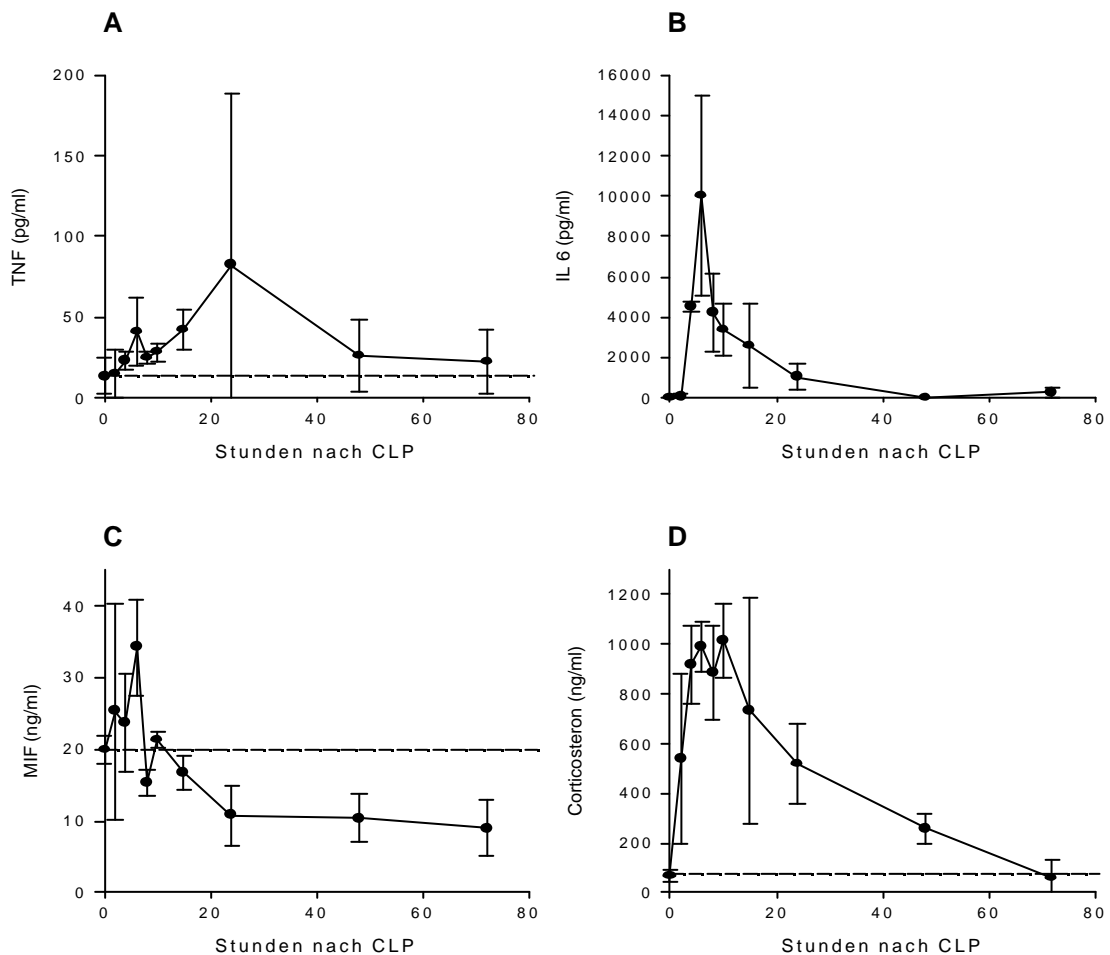


Abbildung 11:
Kinetik der Serumspiegel von Immunmodulatoren nach CLP.

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach CLP wurden die Tiere geblutet (bei jedem Zeitpunkt n = 3). Der Zeitpunkt 0 steht für die Kontrolltiere, die keine CLP hatten. Gemessen wurden die Serumwerte von **A** TNF, **B** IL-6, **C** MIF und **D** Corticosteron.

Der Spiegel des proinflammatorischen Zytokins TNF stieg in den ersten 6 Stunden nach der CLP leicht an (Abb. 11 A). Danach fiel die Serumkonzentration auf die Höhe des Normalwerts ohne Entzündungsgeschehen (Zeitpunkt 0) wieder ab und verweilte auf diesem Niveau. Der Wert bei 24 Stunden war aufgrund eines Ausreissers so hoch, was an der großen Standardabweichung deutlich zu sehen ist, und kann deswegen vernachlässigt werden.

Bei IL-6, einem ebenfalls proinflammatorischen Zytokin, war ein stärkerer Anstieg zu sehen als bei TNF (Abb. 11 B). Bereits nach 6 Stunden war das Maximum der IL-6-Serumkurve, mit einem Anstieg von 0 auf 10000 pg/ml, erreicht. Danach fiel die Konzentration fast ebenso schnell ab, wie sie gestiegen war, und befand sich nach einem Tag wieder auf dem Ausgangspunkt. Dort verblieb sie auch bei den restlichen Testzeitpunkten.

Die Konzentration von MIF, dem Protein, das für die Immunmodulation eingesetzt werden sollte, stieg auch innerhalb der ersten 6 Stunden bis zum Maximum an (Abb. 11 C).

Jedoch war der Anstieg nicht so stark ausgeprägt wie bei IL-6. Außerdem wurde, im Gegensatz zu den anderen proinflammatorischen Zytokinen, ein hoher Ausgangswert von 20 ng/ml gefunden. 10 Stunden nach der CLP erreichte der Serumspegel wieder die Ausgangskonzentration von 20 ng/ml, um nach 24 Stunden unter diesen Wert, auf 10 ng/ml, zu fallen. Dort verblieb er auch bei den restlichen Testzeitpunkten.

Die Kurve von Corticosteron, einem antiinflammatorischen Hormon, zeigte einen sehr starken Anstieg innerhalb der ersten Stunden nach CLP (Abb. 11 D). Nach 4 bis 6 Stunden erreichte die Serumkonzentration ihr Maximum bei 1000 ng/ml und verblieb auf diesem Niveau bis 10 Stunden nach dem Eingriff. Anschließend fiel die Kurve langsam und kontinuierlich ab, bis nach drei Tagen der Ausgangswert erreicht wurde.

Der Verlauf der Kinetik konnte in einem gleichen und unabhängigen Versuch, der von einem anderen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Immunologie durchgeführt wurde, reproduziert werden.

4.4.2. Kinetik der Produktionsfähigkeit von Immunmodulatoren nach CLP

Da die Produktionsunfähigkeit von TNF ein guter Marker für die Immunsuppression ist (Volk, 1991) und manche Zytokine, wie TNF, ohne Stimulierung schwer zu detektieren sind, wurden die Tiere 1,5 Stunden vor der Blutentnahme mit LPS i.v. stimuliert. Mit den gewonnenen Seren wurden die Konzentrationen derselben Immunmodulatoren wie in 4.2.1. bestimmt (Abb. 12).

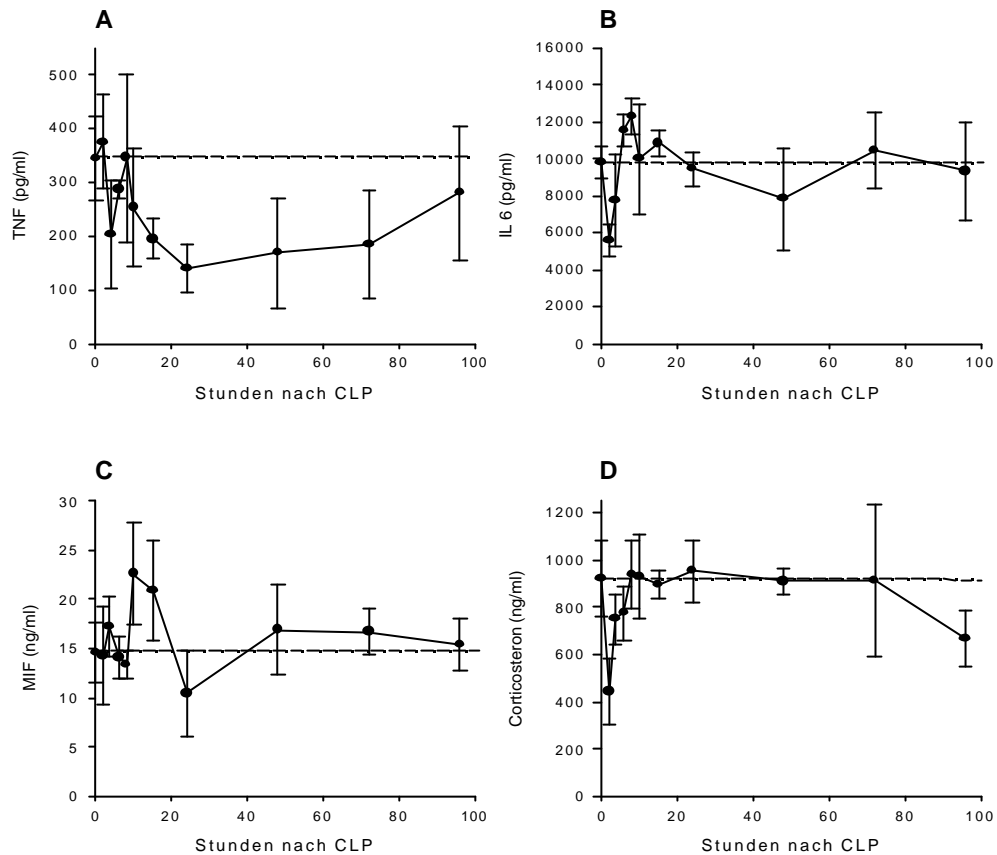


Abbildung 12:

Kinetik der Produktionsfähigkeit von Immunmodulatoren nach CLP.

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach CLP wurden die Tiere geblutet (bei jedem Zeitpunkt n = 3). Der Zeitpunkt 0 steht für die Kontrolltiere, die keine CLP hatten. 1,5 Stunden vorher wurden sie mit LPS (1 µg) i.v. stimuliert. Gemessen wurden die Serumwerte von **A** TNF, **B** IL-6, **C** MIF und **D** Corticosteron.

Die Bereitschaft TNF zu produzieren sank 4 Stunden nach der CLP von 350 pg/ml auf 200 pg/ml ab, um sich nach 8 Stunden fast wieder zu erholen (Abb. 12 A). Danach fiel die Kurve kontinuierlich bis auf 150 pg/ml nach 24 Stunden ab. Dort blieb sie bis zum Tag drei nach dem Eingriff. Erst am vierten Tag nach der Operation stieg die Produktionsbereitschaft von TNF allmählich wieder an, erreichte jedoch den Ausgangswert nicht mehr.

Was die Produktionsbereitschaft von IL-6 betrifft, war nach 2 Stunden ein schneller Abfall der Konzentration von 10000 pg/ml auf 5500 pg/ml, mit einem anschließenden steilen Anstieg der Serumwerte auf 12000 pg/ml, zu beobachten (Abb. 12 B). 8 Stunden nach der CLP sank die Konzentration bis auf den Anfangswert und blieb auf diesem Niveau, mit Ausnahme einiger kleiner Schwankungen, stehen.

Die Bereitschaft, MIF zu produzieren, blieb während der ersten 8 Stunden nach CLP relativ konstant (Abb. 12 C). 10 Stunden nach dem Eingriff kam es zu einem Anstieg der Konzentration, der jedoch nur 5 Stunden anhielt. Nach 24 Stunden war die Kurve etwas unter dem Ausgangswert. Bei späteren Messzeitpunkten pendelte sie sich auf dessen Höhe wieder ein.

Auch was die Produktionsbereitschaft von Corticosteron betrifft war, wie bei MIF, zuerst ein schneller Abfall, von 950 ng/ml auf 450 ng/ml, 2 Stunden nach CLP zu beobachten (Abb. 12 D). Allerdings lag die Konzentration von Corticosteron nach CLP niemals über dem Ausgangswert. 8 Stunden nach der Operation befand sich die Kurve auf Höhe des Ausgangswertes und verblieb dort während der restlichen Messpunkte.

Der Verlauf der Kinetik konnte in einem gleichen und unabhängigen Versuch, der von einem anderen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Immunologie durchgeführt wurde, reproduziert werden.

4.5. Kennzeichen der Immunparalyse

Die Sepsis-induzierte Immunparalyse ist der Extremfall einer durch eine Sepsis hervorgerufenen Immundepression. Es gibt zwei charakteristische Merkmale, an denen man die Immunparalyse erkennt. Ein Kennzeichen ist die Unfähigkeit, auf einen Stimulus hin TNF zu produzieren (Volk, 1991). Diesen Zustand kann man im Tiermodell bereits einen Tag nach CLP beobachten (Abb. 12 A) und er hält bis vier Tage nach CLP an. Erst danach erfolgt ein leichter Anstieg in der Produktionsbereitschaft von TNF. Für die weiteren Experimente wurde Tag zwei nach CLP als Zeitpunkt der Immunparalyse gewählt, da sich die Tiere zu diesem Zeitpunkt sicher in einer immunsupprimierten Phase befinden.

Ein weiteres Merkmal der Immunparalyse ist die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Infektionen. Um dies zu prüfen, wurden Mäuse zwei Tage nach CLP mit Bakterien infiziert und deren Sterberate mit der von Tieren, die keine CLP hatten und nur infiziert wurden (Abb. 13), verglichen.

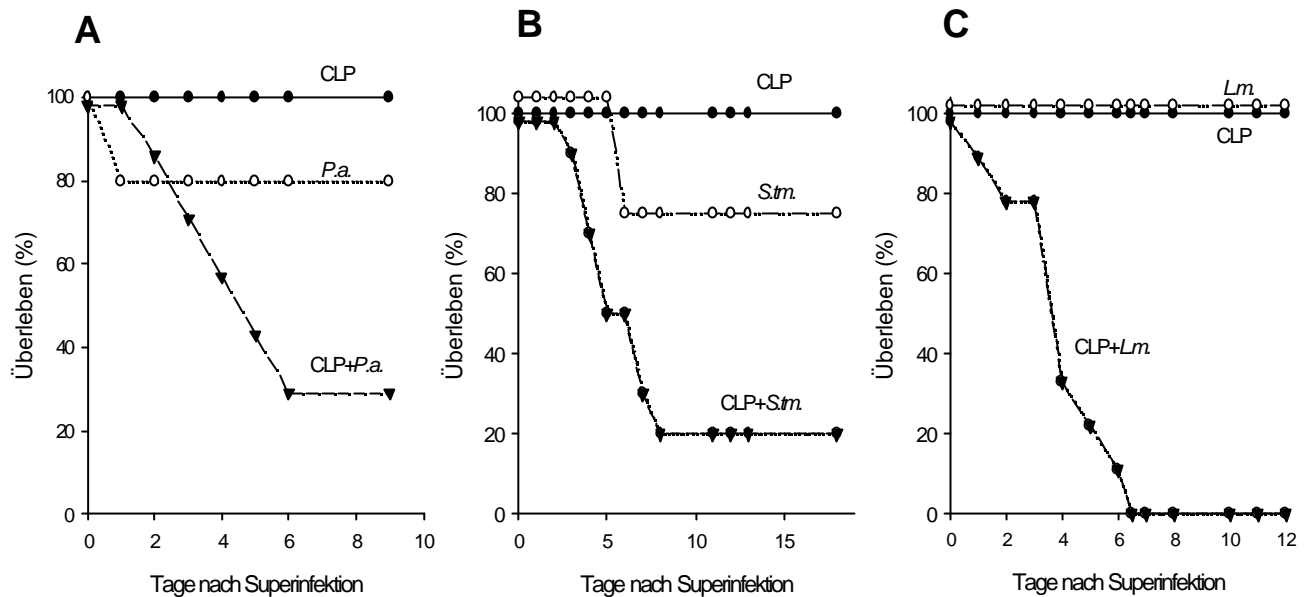


Abbildung 13:

Erhöhte Infektionsanfälligkeit von immunparalysierten Mäusen.

2 Tage nach einer subletale CLP wurden Mäuse mit **A** 5×10^6 *P.a.* i.n. (CLP : CLP+*P.a.*: $P = 0,0385$; *P.a.* : CLP+*P.a.*: $P = 0,159$), **B** $2,3 \times 10^4$ *S.tm.* i.p. (CLP : CLP+*S.tm.*: $P = 0,0175$; *S.tm.* : CLP+*S.tm.*: $P = 0,0927$) und **C** 4×10^6 *L.m.* i.p. (CLP : CLP+*L.m.*: $P = 0,0000$; *L.m.* : CLP+*L.m.*: $P = 0,0020$) infiziert (?) (**A** $n = 7$, **B** $n = 10$, **C** $n = 9$). Als Kontrolle dienten nur mit Bakterien infizierte Mäuse (?) (**A** $n = 5$, **B** $n = 4$, **C** $n = 10$) und Mäuse, die nur eine CLP hatten (?) (jeweils $n = 4$).

Nur für die immunparalysierten Mäuse endete die Infektion mit Bakterien tödlich. Sie konnten eine Sekundärinfektion durch *P.a.* (Abb. 13 A), *S.tm.* (Abb. 13 B) oder *L.m.* (Abb. 13 C) nach einer vorausgegangenen primären Infektion mit ihren eigenen Darmbakterien, die sie im Zuge der CLP erlitten, schlechter kontrollieren. Die Infektion mit Bakterien oder die CLP für sich allein waren nicht für die hohe Mortalität verantwortlich, da beide gut überlebt wurden. Die Überlebensrate nach CLP war in allen Versuchen 100 %, wohingegen einige wenige Tiere an einer Infektion mit *P.a.* (Abb. 13 A) oder *S.tm.* (Abb. 13 B) starben. Deswegen war nur der Überlebensunterschied zwischen den superinfizierten Mäusen und den operierten Mäusen signifikant (Abb. 13 A: $P = 0,0385$ und Abb. 13 B: $P = 0,0175$). Aber auch zwischen den infizierten Tieren und der immunparalysierten Gruppe ließ sich ein deutlicher, wenn auch nicht signifikanter, Unterschied feststellen. Nur in Abbildung 13 C überlebten alle gesunden Tiere eine Infektion mit *L.m.*. Deswegen war der Überlebensunterschied der immunparalysierten Mäuse zu den beiden anderen Gruppen signifikant (CLP : CLP+*L.m.*: $P = 0,0000$; *L.m.* : CLP+*L.m.*: $P = 0,0020$).

Die erhöhte Empfindlichkeit der immunparalisierten Mäusen gegenüber Infektionen spiegelte sich auch in erhöhten Bakterienzahlen in den infizierten Organen wieder (Abb. 14).

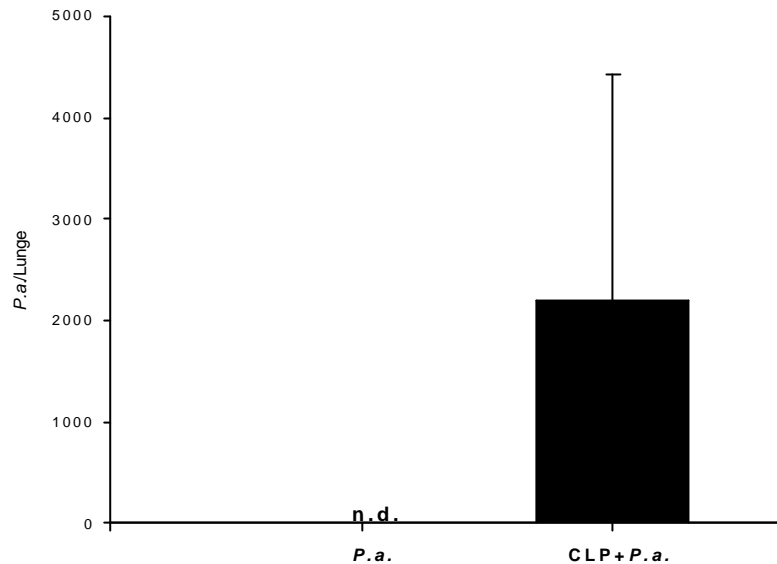


Abbildung 14:

Erhöhte Keimzahlen in immunparalisierten Mäusen nach Infektion.

2 Tage nach subletaler CLP wurden Mäuse mit 8×10^6 *P.a.* intranasal infiziert. 20 Stunden nach der Infektion wurden die Lungen der Mäuse entnommen und die Keimzahl bestimmt. Der Kontrollgruppe wurden nur *Pseudomonaden* verabreicht (jeweils $n = 5$) ($P = 0,167$).

Die gesunden Mäuse konnten die Infektion mit *Pseudomonaden* wirkungsvoll und schnell bekämpfen. Dies zeigte sich dadurch, dass bereits nach 20 Stunden die Bakterien am ursprünglichen Infektionsort, der Lunge, nicht mehr detektierbar (n.d.) waren. In den Lungen der immunsupprimierten Tiere hingegen befand sich eine beträchtliche Anzahl an *P.a.*. Dieses Ergebnis gilt allerdings nur für *P.a.*, da es mit *S.tm.* nicht reproduziert werden konnte.

4.6. Die Rolle von MIF in der Immunparalyse

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Regulation von MIF beim endotoxischen und septischen Schock von großer Bedeutung für das Überleben ist (Bernhagen, 1993, Calandra, 2000). Daher drängte sich die Frage auf, ob dies auch beim bisher wenig erforschten und deswegen auch kaum therapierbaren Phänomen der Immunparalyse der Fall ist.

4.6.1. Neutralisation von MIF in der Immunparalyse

Die Neutralisation von MIF wurde schon erfolgreich beim endotoxischen und septischen Schock angewandt (Bernhagen, 1993, Calandra, 2000). Um herauszufinden, ob dies auch bei der Sepsis-induzierten Immunparalyse der Fall ist, wurden immunparalysierte Mäuse mit Antikörpern gegen MIF behandelt und danach mit verschiedenen Bakterienstämmen infiziert (Abb. 15).

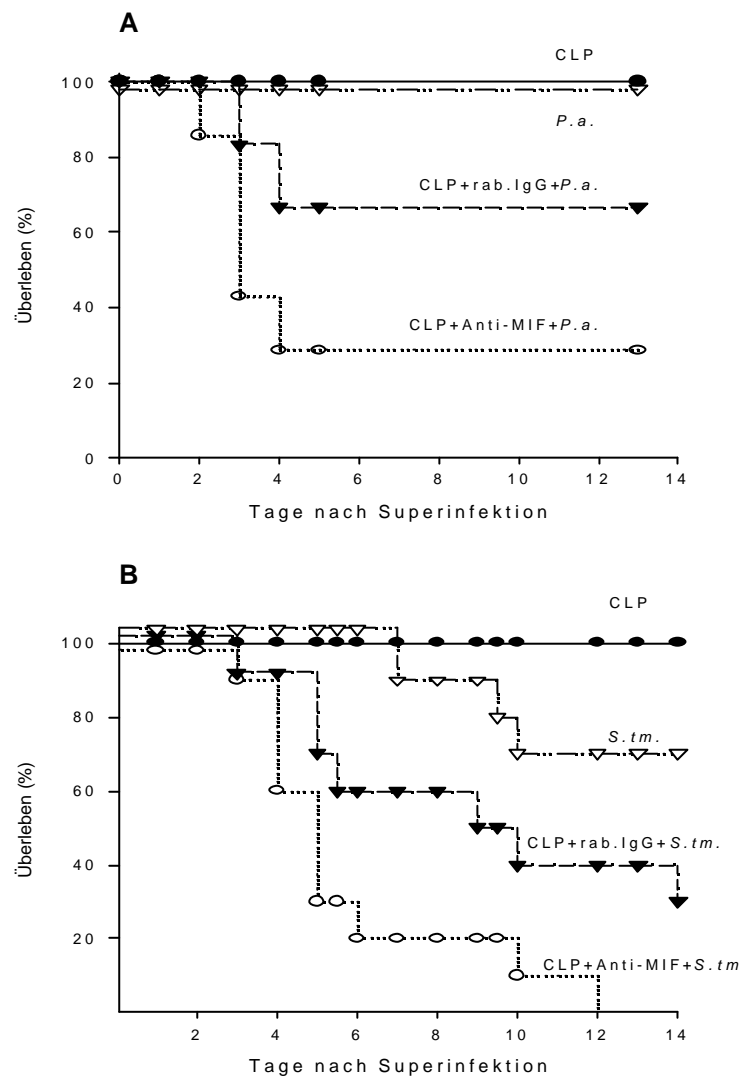


Abbildung 15:
Neutralisation von MIF erhöht die Mortalitätsrate in immunparalysierten Mäusen nach Superinfektion.

2 Tage nach subletaler CLP wurden Mäuse mit 100 µg anti MIF Antikörper (?) (**A** n = 7; **B** n = 10), oder 100 µg Kontrollantikörper (rab. IgG) (?) (**A** n = 6; **B** n = 10) behandelt. 1 Stunde später wurden sie mit **A** 3×10^5 *P.a.* i.n. (anti-MIF : rab.IgG: P = 0,1448) und **B** 5×10^3 *S.tm.* i.p. (anti-MIF : rab.IgG: P = 0,0298) infiziert. Als Kontrolle dienten Mäuse, die entweder nur mit CLP (?) (**A** n = 4; **B** n = 7) oder Bakterien (▽) (**A** n = 4; **B** n = 10) belastet wurden.

Die Neutralisation von MIF vor einer Superinfektion mit *P.a.* schadete den immunparalisierten Mäusen (Abb. 15 A). Die Behandlung mit Antikörpern gegen MIF führte zu einer Sterberate von 70 % im *P.a.*-Superinfektionsmodell. Dagegen starben in der mit Kontrollantikörpern behandelten Gruppe nur 30 %. Die CLP oder die Bakterieninfektion allein war nicht der Grund für die hohe Mortalität, da beide zu 100 % überlebt wurden.

Auch im *S.tm.*-Superinfektionsmodell schadete die Neutralisation von MIF (Abb. 15 B). Keine einzige immunparalytierte Maus überlebte die Applikation von Antikörpern gegen MIF vor der Infektion mit *S.tm.*, wohingegen immerhin 30 % der mit Kontrollantikörpern behandelten Gruppe überlebten. Die Infektion mit *Salmonellen* allein war aggressiver als die mit *Pseudomonaden*, da 30 % der Tiere an ihr verstarben. Die CLP allein, der Auslöser der Immunparalyse, wurde sehr gut vertragen und zu 100 % überlebt.

4.6.2. Gabe von exogenem MIF in der Immunparalyse

Die Ergebnisse, dass die Neutralisation von MIF in der Immunparalyse zu einer erhöhten Mortalität führt, legten nahe, zu überprüfen, ob die Gabe von exogenem MIF die Anfälligkeit gegenüber Superinfektionen erniedrigt. Dafür wurde immunparalisierten Mäusen rhMIF intraperitoneal injiziert und die Tiere danach mit verschiedenen Bakterienstämmen infiziert (Abb. 16).

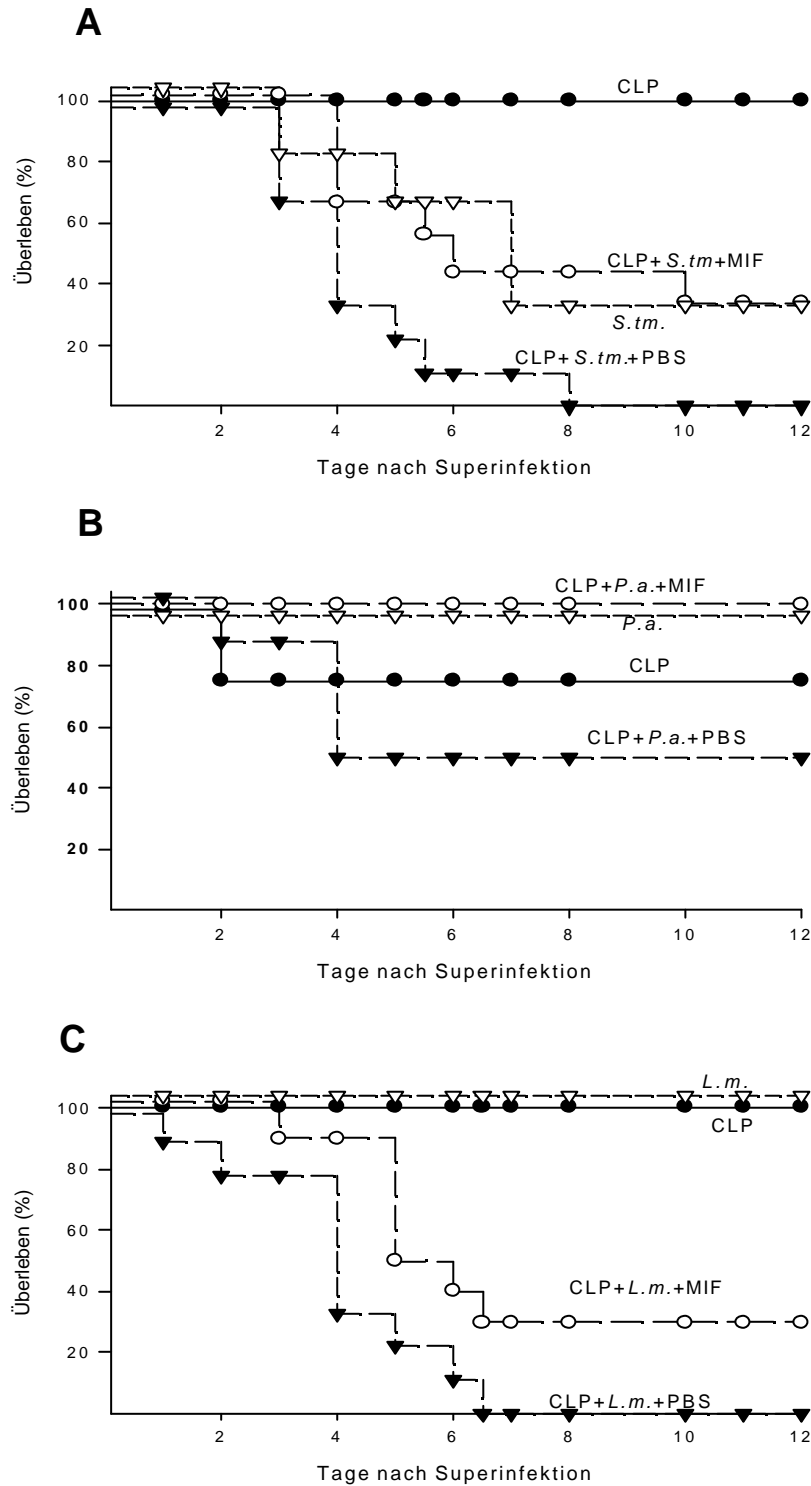


Abbildung 16:
Exogenes MIF senkt die Mortalitätsrate von immunparalysierten Mäusen nach Superinfektion.

2 Tage nach subletaler CLP wurde Mäusen 20 µg rhMIF (?) (**A** n = 9; **B** n = 8; **C** n = 10), oder 100 µl PBS (?) (**A** n = 9; **B** n = 8; **C** n = 9) i.p. injiziert. Anschließend wurden sie **A** 6 Stunden später mit 5×10^3 *S. tm.* i.p. (MIF : PBS: P = 0,013), **B** 1 Stunde später mit 2×10^6 *P. a.* i.n. (MIF : PBS: P = 0,026) und **C** 6 Stunden später mit 4×10^6 *L. m.* i.p. (MIF : PBS: P = 0,027) infiziert. Als Kontrolle dienten Mäuse, die entweder nur mit CLP (?) (jeweils n = 4) oder Bakterien (▽) (**A** n = 6; **B** n = 4; **C** n = 9) belastet wurden.

Im *S.tm.*-Superinfektionsmodell schützte die Applikation von exogenem MIF vor den tödlichen Folgen der Infektion (Abb. 16 A). Aus der Kontrollgruppe, den immunparalisierten Mäusen, denen PBS injiziert wurde, überlebte keine Maus die Superinfektion, wohingegen 30 % in der mit MIF behandelten Gruppe überlebten. Die Medikation mit MIF war in diesem Fall sogar so wirkungsvoll, dass der immunparalytische Zustand aufgehoben wurde. Dies wurde durch die Tatsache deutlich, dass bei den Mäusen, die nur mit Bakterien infiziert wurden, genauso wie bei der immunparalisierten Gruppe, die mit MIF behandelt wurde, 30 % überlebten.

Auch bei einer *Pseudomonaden*infektion während der Immunparalyse schützte exogenes MIF (Abb. 16 B). Dies zeigte sich im Überlebensunterschied von 50 % in der PBS-Kontrollgruppe gegenüber 100 % in der MIF-Gruppe. Wie bei der Superinfektion mit *S.tm.* war auch bei den *Pseudomonaden* die Immunparalyse, was die Infektionsempfindlichkeit betraf, aufgehoben. Sowohl die immunparalisierten, als auch die gesunden Mäuse, überlebten die Infektion mit *P.a.* zu 100 %. Der Abfall der Überlebenskurve der subletalen CLP auf 75 % lässt sich mit dem Tod einer Maus und der geringen Anzahl der Tiere in dieser Gruppe erklären.

Bei der Superinfektion mit *L.m.* kam es nicht zu einer Aufhebung der Immunparalyse (Abb. 16 C). Die Infektion mit *Listerien* wurde von gesunden Mäusen zu 100 % überlebt, wohingegen 70 % der mit MIF behandelten immunparalisierten Tiere starben. Dennoch überlebten von den immunparalisierten Mäusen, die mit MIF behandelt wurden, 30 % mehr als in der PBS-Kontrollgruppe.

4.6.3. Bestimmung des besten Zeitpunkts und der optimalen Dosis für die Gabe von MIF im Superinfektionsmodell

Es sollte untersucht werden, ob es bessere Zeitpunkte als 6 bzw. 1 Stunde vor einer Superinfektion für die Applikation von MIF gibt und ob ein Unterschied zwischen den beiden gewählten Zeitpunkten besteht. Die Behandlung sollte während der Immunparalyse und vor der Superinfektion erfolgen, was zu einer starken Einschränkung des möglichen Zeitfensters für die MIF-Behandlung führte. Da die Immunparalyse frühestens einen Tag nach CLP beginnt und die Superinfektion am Tag zwei stattfinden sollte, wurde ein Zeitpunkt 16 Stunden vor Superinfektion, also 32 Stunden nach CLP, als früheste Behandlungszeit gewählt.

Außerdem sollte die Applikation von MIF vor einer Manifestation nosokomialer Infektionen bei immunparalisierten Menschen schützen, da diese eine häufige Todesursache für die

Patienten darstellen. Deswegen wurde im Tiermodell nur vor der Superinfektion mit MIF therapiert (Abb.17).

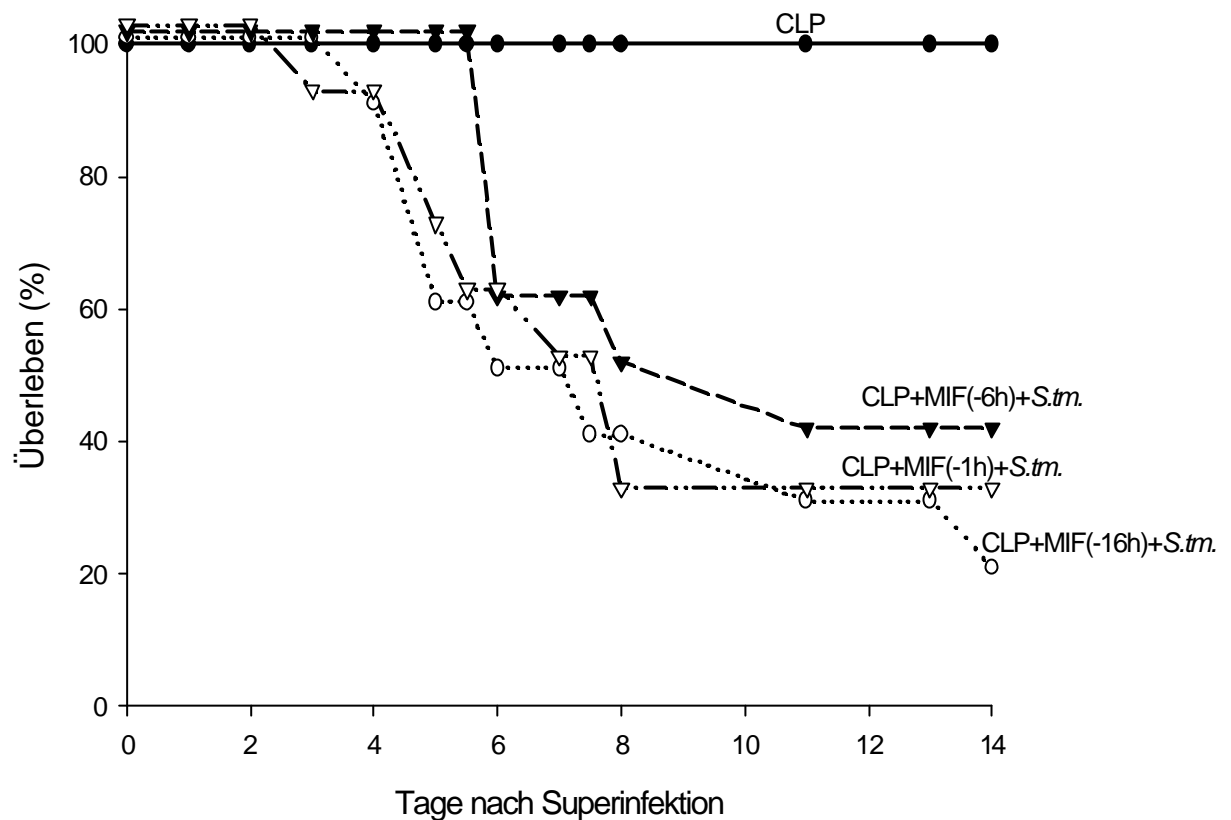


Abbildung 17:
Kinetik der Applikation von MIF vor der Superinfektion.

2 Tage nach subletaler CLP wurden Mäuse mit 4×10^4 *S.tm.* i.p. infiziert. Die Tiere wurden 16 (?), 6 (?) und 1 (∇) (jeweils n = 10) Stunde vor der Infektion mit 20 µg rhMIF i.p. behandelt. Als Kontrolle dienten Tiere, die nur eine CLP bekommen hatten (?) (n = 4).

In diesem Experiment schien der Zeitpunkt 6 Stunden vor der Superinfektion als günstigster, da infolge der Gabe von MIF zu diesem Zeitpunkt die Tiere später anfangen zu sterben und die Überlebensrate mit 40 % am höchsten lag. Die Kurven bei der Behandlung mit MIF 1 bzw. 16 Stunden vor der Superinfektion liefen fast parallel und zeitgleich. Dennoch starben beim früheren Zeitpunkt der MIF-Applikation im Endeffekt 10 % mehr als beim Zeitpunkt 1 Stunde. Für die weiteren Versuche wurde deswegen der Zeitpunkt 6 Stunden vor der Superinfektion gewählt.

Nachdem der Zeitpunkt für die Behandlung mit MIF festgelegt worden war, sollte nun getestet werden, ob eine andere Dosis zu einer besseren Wirkung führt, als die bisher verwendeten 20 µg und, ob sich höhere Dosen schädlich im Superinfektionsmodell

auswirken. Zu diesem Zweck wurden immunparalytierte Mäuse 6 Stunden vor einer Infektion mit *S.tm.* mit verschiedenen Dosen von rhMIF behandelt (Abb. 18).

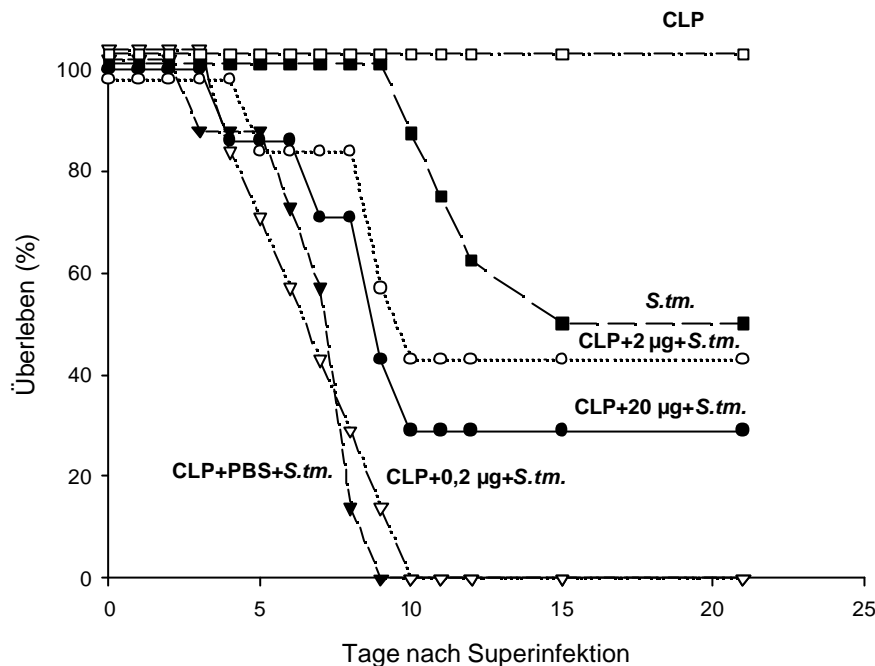


Abbildung 18:

Dosis-Wirkungs-Beziehung von MIF in der Immunparalyse.

2 Tage nach subletaler CLP und 6 Stunden vor der Superinfektion mit $6,25 \times 10^3$ *S.tm.* i.p. wurden Mäuse mit 0,2 µg (▽), 2 µg (?) und 20 µg (?) rhMIF bzw. 100 µl PBS (?) i.p. behandelt (jeweils n = 7). Als Kontrolle dienten Mäuse, die nur eine CLP (?) (n = 3) oder Bakterien (!) (n = 8) bekommen hatten (PBS : 0,2 µg: P = 0,8017; PBS : 2 µg: P = 0,0239; PBS : 20 µg: P = 0,0959; 2 µg : 20 µg: P = 0,5258).

Eine Dosis von 0,2 µg MIF hatte keine Auswirkung auf eine Superinfektion von immunparalytierten Mäusen und war deswegen zu gering. In beiden Gruppen überlebte kein Tier die Infektion mit *S.tm.* Bei Dosen von 2 µg und 20 µg hingegen war ein Schutz zu erkennen, da dort zum Ende des Experiments 43 % respektive 29 % der Mäuse überlebten. Diese beiden Kurven verliefen zu Anfang ebenfalls fast parallel und unterschieden sich erst zum Schluss dadurch, dass bei einer Dosis von 2 µg eine Maus mehr überlebte. Dennoch konnte auch in diesen beiden Fällen der Zustand der Immunparalyse nicht komplett aufgehoben werden, was sich daran zeigte, dass aus der Gruppe der gesunden Mäuse, die nur mit *S.tm.* infiziert wurden, 50 % der Tiere, und damit mehr als bei den anderen beiden Gruppen, am Ende des Experiments noch lebten. Für weitere Versuche wurde die Dosis von 20 µg beibehalten, da sie, obwohl sie in Abbildung 17 etwas schlechter abschnitt, in einem anderen Experiment deutlich mehr Schutz vor einer Superinfektion zeigte als 5 µg rhMIF und man in demselben Versuch mit 50 µg die gleichen Effekte wie mit 20 µg beobachten konnte, so dass eine Dosissteigerung von MIF zwar möglich, aber nicht wirkungsvoll war (Daten sind hier nicht gezeigt).

4.6.4. Induktion proinflammatorischer Zytokine in immunparalisierten Mäusen durch exogenes MIF

Die vorangegangenen Experimente zeigten, dass rhMIF immunparalisierte Mäuse vor dem Tod durch Superinfektion schützt. Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, worauf die Schutzwirkung von MIF beruht. Da die Applikation von MIF bei gesunden Mäusen zu einer systemischen Erhöhung von Entzündungsmediatoren führt (Abb. 7), besteht die Möglichkeit, dass dies auch im Zustand der Immunparalyse geschieht. Insbesondere die vermehrte Bildung und Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen könnte den immunparalisierten Tieren helfen, die bei einer Superinfektion eindringenden Bakterien besser zu bekämpfen und damit einen Überlebensvorteil zu erlangen. Um zu testen, ob dies der Fall ist, wurden die TNF-mRNA-Werte von Milzzellen immunparalysierter Mäuse, die mit rhMIF behandelt und mit LPS stimuliert worden waren, bestimmt (Abb. 19).

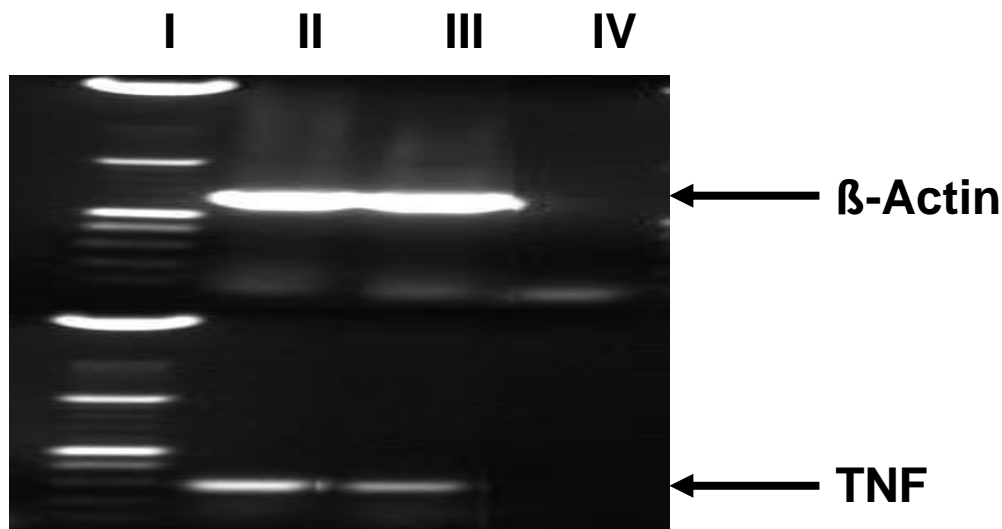


Abbildung 19:
Exogenes MIF induziert die Bildung von TNF-mRNA in Milzzellen von immunparalisierten Mäusen.

2 Tage nach subletaler CLP wurden Mäuse mit 20 µg rhMIF oder 100 µl PBS (jeweils n = 3) i.p. behandelt. 6 Stunden später wurden sie mit 1 µg LPS i.v. stimuliert. 90 Minuten nach dem Stimulus wurden die Milzen der Mäuse entnommen und daraus RNA isoliert. Die Auswertung erfolgte mittels PCR. Die RNA jeder Gruppe wurde vereint. Spur I: Standard. Spur II: Behandlung mit rhMIF. Spur III: Kontrollbehandlung mit PBS. Spur IV: Negativkontrolle (Wasser).

Aufgrund der stärkeren TNF-Bande konnte man semiquantitativ feststellen, dass rhMIF (Abb. 19; Spur II) in immunparalisierten Mäusen zu einer, im Vergleich zur PBS-Kontrolle (Abb. 19; Linie III) erhöhten Produktion von TNF-mRNA führte. Die jeweils eingesetzten

Mengen an mRNA waren gleich, da die Größe und Intensität der beiden β -Actin Banden übereinstimmen.

Da rhMIF die Synthese von TNF in Milzzellen von immunparalisierten Mäusen induzierte, sollte überprüft werden, ob dies auch zu höheren Serumkonzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen führt (Abb. 20).

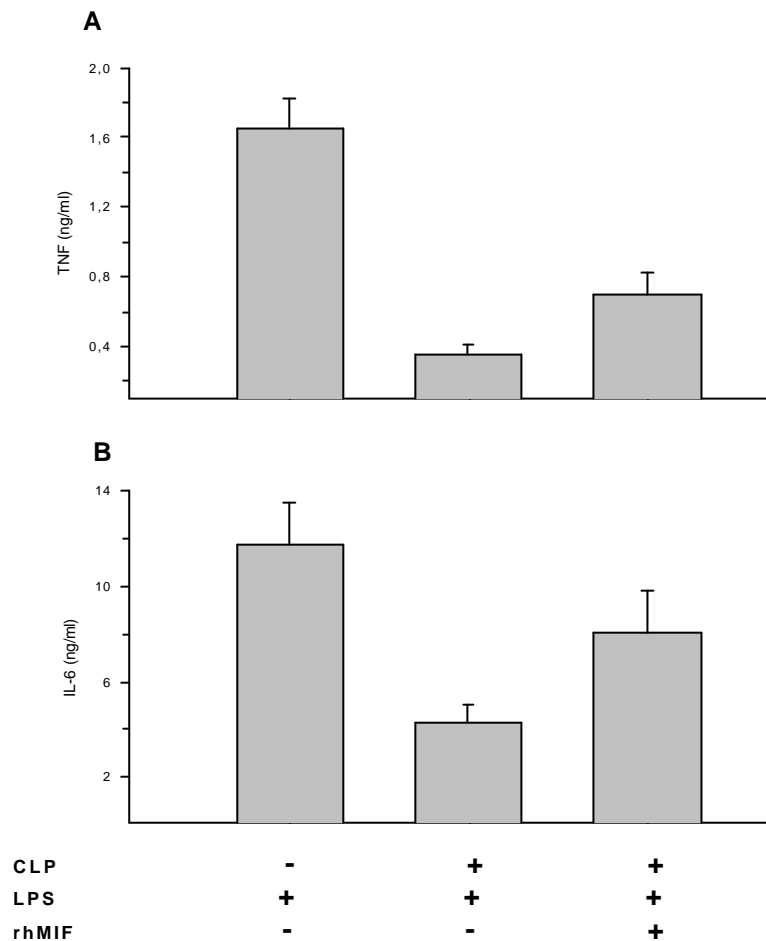


Abbildung 20:
Exogenes MIF erhöht die Serumkonzentration von proinflammatorischen Zytokinen in immunparalisierten Mäusen.

2 Tage nach subletaler CLP wurden Mäuse mit 20 μ g rhMIF oder 100 μ l PBS i.p. behandelt (jeweils n = 5). 6 Stunden später wurden sie mit 1 μ g LPS i.v. stimuliert. 90 Minuten nach dem Stimulus wurden die Tiere geblutet und aus dem Serum wurden die Zytokinkonzentrationen von **A** TNF (gesunde Maus : CLP+MIF: P = 0,008; CLP+PBS : CLP+MIF: P = 0,008; gesunde Maus : CLP+PBS: P = 0,008) und **B** IL-6 (gesunde Maus : CLP+MIF: P = 0,016; CLP+PBS : CLP+MIF: P = 0,008; gesunde Maus : CLP+PBS: P = 0,008) mittels ELISA gewonnen. Als Kontrolle dienten gesunde Mäuse, die nur stimuliert worden waren (n = 5).

Die gesteigerte de-novo-Synthese von proinflammatorischen Zytokinen (Abb. 19) spiegelte sich in den Serumkonzentrationen wieder. Es konnte eine signifikante Erhöhung der TNF-

Spiegel nach der Behandlung mit MIF, im Gegensatz zur PBS-Kontrolle (mittlerer Balken), festgestellt werden (Abb. 20 A; $P = 0,008$). Jedoch konnte durch die MIF-Therapie nicht die gleiche Konzentration wie bei den gesunden Mäusen erreicht werden, da deren TNF-Produktionsfähigkeit (linker Balken) signifikant höher war ($P = 0,008$).

Eine signifikante Erhöhung der Serumkonzentration sieht man ebenfalls bei IL-6, einem weiteren wichtigen proinflammatorischen Zytokin (Abb. 20 B; $P = 0,008$). Die Therapie der immunparalisierten Mäuse mit rhMIF schlägt so gut an, dass die IL-6 Konzentration 75 % des Werts für gesunde Mäuse erreicht.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob die erhöhte Produktion von TNF-mRNA in den Milzzellen auch auf Stimulus hin zur vermehrten Sekretion von bioaktiven TNF führt. Dafür wurden Milzzellen, die aus immunparalisierten Mäusen gewonnen wurden, über Nacht stimuliert und danach die Konzentration an TNF mittels TNF-Bioaktivitätstest ermittelt (Abb. 21).

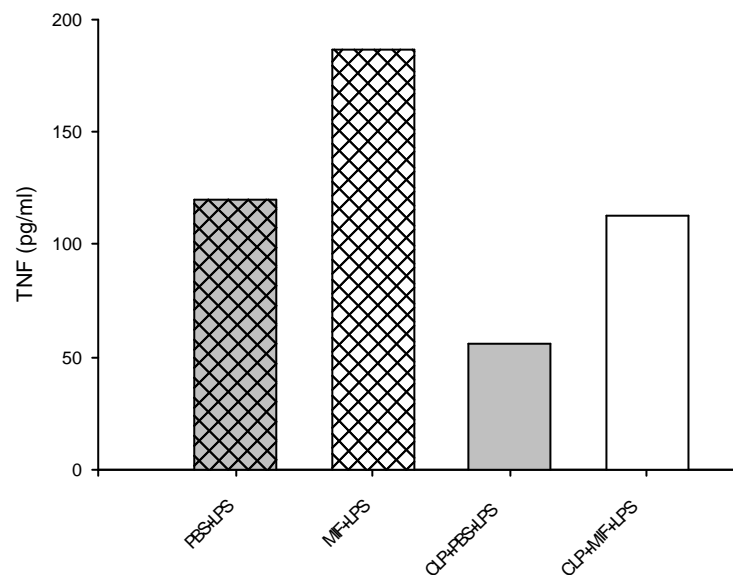


Abbildung 21:

Exogenes MIF erhöht die Sekretion von bioaktivem TNF aus Milzzellen.

2 Tage nach subletaler CLP wurden Mäuse mit 20 μg rhMIF oder 100 μl PBS i.p. behandelt (jeweils $n = 3$). 7,5 Stunden später wurden die Milzen entnommen und zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Die Suspensionen aus der gleichen Gruppe wurden vereinigt, über Nacht mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert und am nächsten Tag die TNF-Konzentration mittels TNF-Bioaktivitätstest bestimmt. Als Kontrolle dienten gesunde Mäuse (schraffierte Balken) die, bis auf die CLP, die gleiche Behandlung erfuhren (jeweils $n = 3$). Durch die Vereinigung der Proben waren keine statistischen Aussagen möglich.

Die Applikation von rhMIF bei immunparalysierten Mäusen führte nach einem Stimulus nicht nur zur erhöhten Produktion von TNF-mRNA sondern auch zur verstärkten Sekretion des biologisch aktiven proinflammatorischen Zytokins. Dies konnte man deutlich im TNF-Bioassay an der Verdopplung der TNF-Konzentration der immunparalysierten Tiere, die mit rhMIF behandelt wurden, im Vergleich zur PBS Kontrolle sehen (Abb. 21). Die Behandlung mit rhMIF hob, in Bezug auf die Sekretion von TNF, die Immunparalyse auf, da die gleiche Konzentration wie bei gesunden Mäusen erreicht wurde. Nur die Applikation von MIF bei gesunden Mäusen erzeugte noch höhere TNF-Spiegel. Dies stimmte mit der erhöhten Serumkonzentration von TNF nach Injektion von MIF bei gesunden Mäusen überein (Abb. 7 A).

Da die Kinetikversuche in Bezug auf das Überleben einer Superinfektion keine Unterschiede zwischen den Zeitpunkten für die Applikation von rhMIF ergaben (Abb. 17), wurde getestet, ob dies auch für die Erhöhung der Entzündungsbereitschaft gilt (Abb. 22).

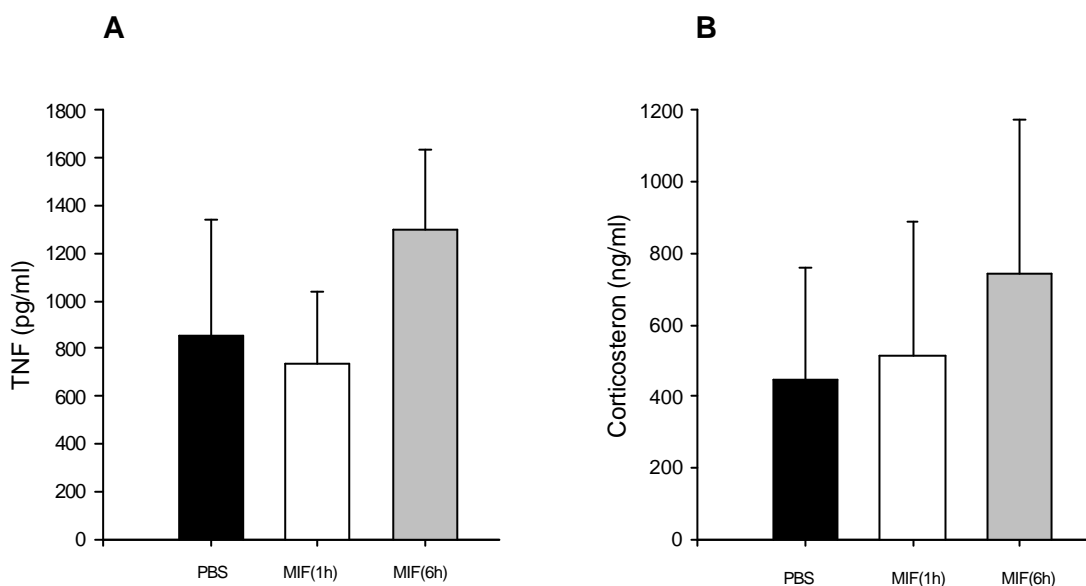


Abbildung 22:

Vergleich der MIF-Gabe 6 und 1 Stunde vor Auslösung von TNF und Corticosteron.

2 Tage nach subletaler CLP wurden Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten mit 20 µg rhMIF oder 100 µl PBS i.p. behandelt (jeweils n = 5). 6 Stunden (graue Balken) bzw. 1 Stunde (schwarze und weiße Balken) danach wurden die Tiere mit **A** 1 µg bzw. **B** 5 µg LPS i.v. stimuliert. **A** 90 Minuten später wurden die Mäuse geblutet und die TNF-Serumkonzentration mittels TNF-Bioaktivitätstest bestimmt (PBS : MIF-1h: P = 0,800; PBS : MIF-6h: P = 0,476; MIF-1h : MIF-6h: P = 0,071). **B** 4 Stunden später wurden die Mäuse geblutet und die Corticosteron-Serumkonzentration mittels RIA bestimmt (PBS : MIF-1h: P = 0,818; PBS : MIF-6h: P = 0,234; MIF-1h : MIF-6h: P = 0,327).

Der Zeitpunkt 6 Stunden vor dem Stimulieren mit LPS war in Bezug auf die TNF-Produktionsbereitschaft besser. Der TNF-Spiegel der mit rhMIF behandelten immunparalisierten Mäuse war höher bei sechsstündiger Vorbehandlung als nach 1 Stunde (Abb. 22 A). Die einstündige Vorbehandlung erreichte nur die Konzentration der PBS-Kontrolle, und zeigte somit keine Wirkung in diesem Experiment.

Auch bei Corticosteron, einem wichtigen Gegenregulator von Entzündungen, war die sechsstündige Vorbehandlung mit rhMIF deutlich effektiver, was durch die höhere Konzentration bei 6 Stunden im Vergleich zu der beim Zeitpunkt 1 Stunde deutlich wurde (Abb. 22 B).

4.7. Der Einfluss der Neutralisation von MIF zu Beginn der Sepsis auf die Entstehung der Immunparalyse

Da die Neutralisation von MIF zu Beginn eines letalen septischen oder endotoxischen Schocks schützt (Bernhagen, 1993, Calandra, 2000), sollte überprüft werden, ob MIF auch Auswirkungen auf die Entstehung der Immunparalyse hat.

4.7.1. Neutralisation von MIF zu Beginn der Sepsis erhöht die Überlebenschancen im Superinfektionsmodell

Um zu überprüfen, ob die Neutralisation von MIF zu Beginn der Sepsis Auswirkungen auf die Entstehung der Immunparalyse hat, wurde Mäusen gleichzeitig zur CLP Antikörper gegen MIF verabreicht und zwei Tage danach die Empfindlichkeit der Tiere gegenüber Superinfektionen getestet (Abb. 23).

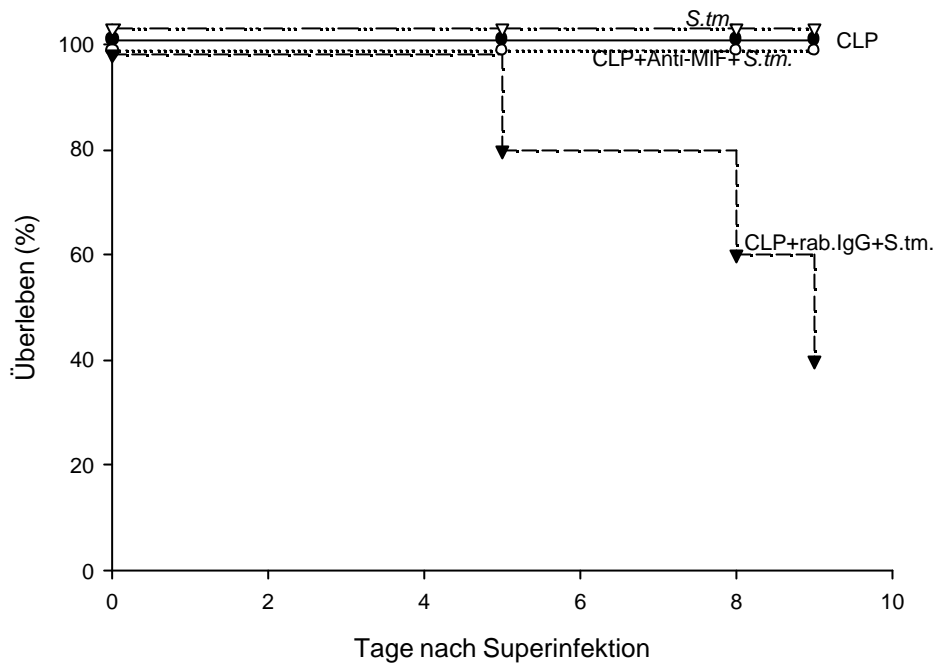


Abbildung 23:

Neutralisation von MIF zum Zeitpunkt der CLP erniedrigt die Empfindlichkeit für Superinfektionen.

Gleichzeitig zur subletalen CLP wurden den Mäusen 100 µg Antikörper gegen MIF (?) (n = 8) bzw. 100 µg rab. IgG (?) (n = 5) gegeben. 2 Tage später wurden die Tiere mit 6×10^3 *S.tm.* i.p. infiziert (rab.IgG : anti-MIF: P = 0,0132). Als Kontrolle dienten Mäuse, die nur eine CLP (?) (n = 4), oder Bakterien (∇) (n = 8) bekommen hatten.

Neutralisieren von MIF zum Zeitpunkt der CLP senkte die Empfindlichkeit für Superinfektionen. Die Mäuse, die zum Zeitpunkt der CLP Antikörper gegen MIF erhalten haben, überlebten alle eine Infektion mit *S.tm.*, wohingegen 60 % der mit einem Kontrollantikörper (rab. IgG) behandelten Gruppe starben. Dies bedeutet, dass die Neutralisation von MIF zum Zeitpunkt der subletalen CLP ein Ausbleiben der Immunparalyse bewirkt.

4.7.2. Neutralisation von MIF zu Beginn der Sepsis und die Auswirkungen auf die proinflammatorischen Zytokinspiegel

Um herauszufinden, welche unmittelbaren Auswirkungen die Neutralisation von MIF gleichzeitig zur subletalen CLP hat, wurden die LPS-induzierten Spiegel von TNF und IL-6 kurz nach der CLP gemessen (Abb. 24).

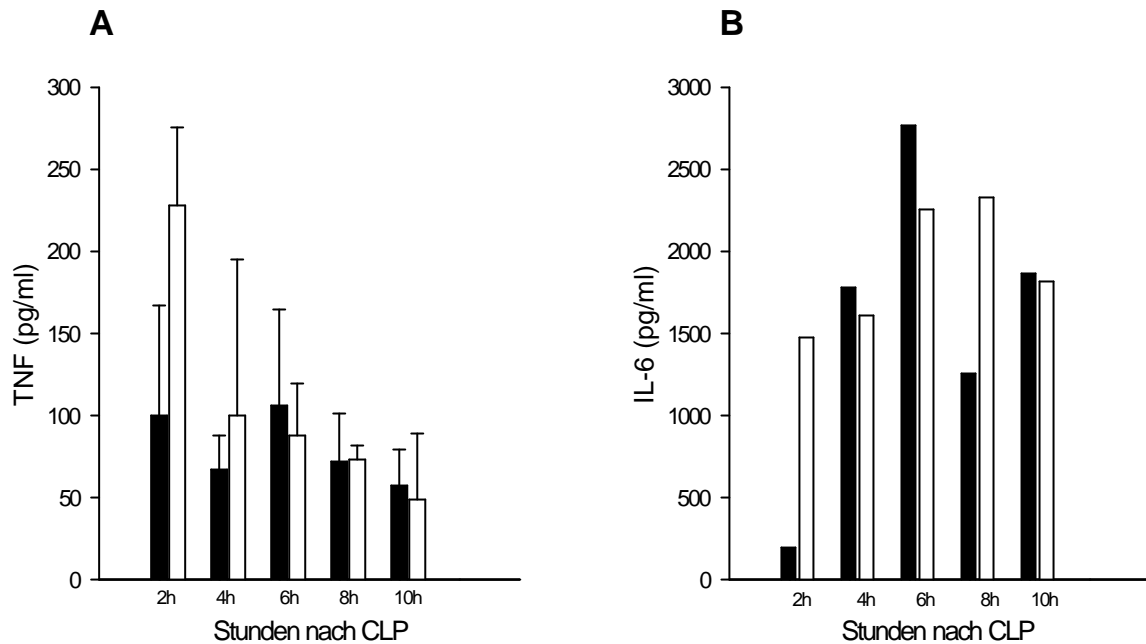


Abbildung 24:

Neutralisation von MIF zum Zeitpunkt der CLP reduziert die Spiegel von proinflammatorischen Zytokinen.

Gleichzeitig zur subletalen CLP wurde Mäusen 100 µg Antikörper gegen MIF (schwarze Balken) bzw. 100 µg rab. IgG (weiße Balken) appliziert. 90 Minuten vor den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere (jeweils n = 3) mit 1 µg LPS i.v. stimuliert und anschließend wurde ihnen Blut entnommen. Mit den Seren wurden mittels ELISA die Werte von **A** TNF (2h: P = 0,029; 4h: P = 1,000) und **B** IL-6 (Proben für gleiche Zeitpunkte wurden vereint; deswegen waren keine statistischen Aussagen möglich) bestimmt.

Die gleichzeitige Neutralisation von MIF zum Zeitpunkt der CLP bewirkte kurz nach dem Eingriff (2 Stunden nach der CLP) eine signifikante Reduktion der TNF-Serumspiegel im Gegensatz zur PBS-Kontrollgruppe (Abb. 24 A; P = 0,029). Dieser Effekt war 4 Stunden nach der CLP nur noch schwach ausgeprägt und zum Zeitpunkt 6 gar nicht mehr vorhanden.

2 Stunden nach CLP und Neutralisation von MIF kam es ebenfalls zu einer starken Senkung der IL-6 Serumkonzentration (Abb. 24 B) im Vergleich zu den Kontrolltieren. Bereits nach 4 Stunden war die antiinflammatorische Wirkung aufgehoben, da die IL-6-Werte für anti-MIF und PBS gleich waren. Jedoch kam es 8 Stunden nach CLP noch einmal zu einer deutlichen Reduzierung der IL-6 Serumkonzentration.

Da durch Neutralisieren von MIF zum Zeitpunkt der CLP die Mäuse weniger empfindlich für eine Superinfektionen waren (Abb. 23), sollte überprüft werden, ob auch ihre TNF-Produktionsfähigkeit noch vorhanden war (Abb. 25).

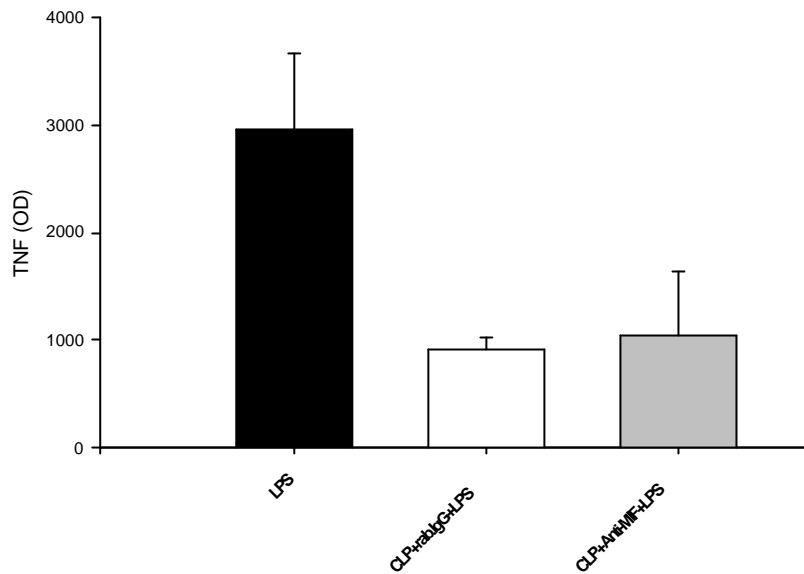


Abbildung 25:

Neutralisation von MIF zum Zeitpunkt der CLP hat keinen Einfluss auf das Immunparalysekennzeichen TNF-Produktionsfähigkeit.

Gleichzeitig zur subletalen CLP wurde Mäusen 100 µg Antikörper gegen MIF (grauer Balken) (n = 4) bzw. 100 µg rab. IgG (weißer Balken) (n = 3) appliziert. 2 Tage später wurden die Tiere mit 1 µg LPS i.v. stimuliert, 90 Minuten später geblutet und aus dem Serum die TNF-Konzentration mittels ELISA bestimmt (gesunde Mäuse : anti-MIF: P = 0,029; gesunde Mäuse : rab.IgG: P = 0,057; anti-MIF : rab.IgG: P = 1,0000). Die TNF-Werte sind hier als Messwerte des Instruments (OD) angegeben. Als Kontrolle dienten gesunde Mäuse, die nur stimuliert wurden (schwarzer Balken) (n = 4).

Die gleichzeitige Neutralisation von MIF zum Zeitpunkt der CLP hatte überhaupt keinen Effekt auf die TNF-Produktionsfähigkeit 2 Tage danach, da für den Kontrollantikörper die gleichen Werte erreicht wurden (P = 1,0000). Die TNF-Werte konnten hier nur als Messwerte des ELISA Readers angegeben werden. Es sind somit keine absoluten Aussagen über die Konzentration von TNF möglich, sondern man kann die verschiedenen Gruppen nur untereinander vergleichen.

4.8. Einfluss der Glucocorticoide auf die Immunparalyse

Da MIF ein Gegenspieler der Glucocorticoide ist (Calandra, 1995) und Glucocorticoide selbst eine starke antiinflammatorische Wirkung besitzen, wurde untersucht, inwieweit die Modulation der Glucocorticoidspiegel die Immunparalyse beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde Mifepriston (RU 486), ein synthetisches Steroid mit antigestagener Wirkung, eingesetzt, das bei hohen Dosen alle Glucocorticoid-Rezeptoren blockiert und somit keine Glucocorticoidwirkung zulässt (Horwitz, 1992).

4.8.1. Bestimmung eines geeigneten Lösungsmittels für Mifepriston in in vivo Experimenten

Mifepriston ist sehr lipophil und damit schwer in hydrophilen Lösungsmitteln löslich. In der Literatur sind verschiedene Möglichkeiten beschrieben, um Mifepriston in Lösung zu bringen und in Tierexperimenten einzusetzen (Quadrilatero, 2005, Soulet, 2003). Da der antagonistische Glucocorticoid-Rezeptorantagonist am Ort der Sepsisentstehung, also intraperitoneal, eingesetzt werden sollte, musste die Verträglichkeit von Lösungsmitteln unter diesen Umständen neu getestet werden (Abb. 26).

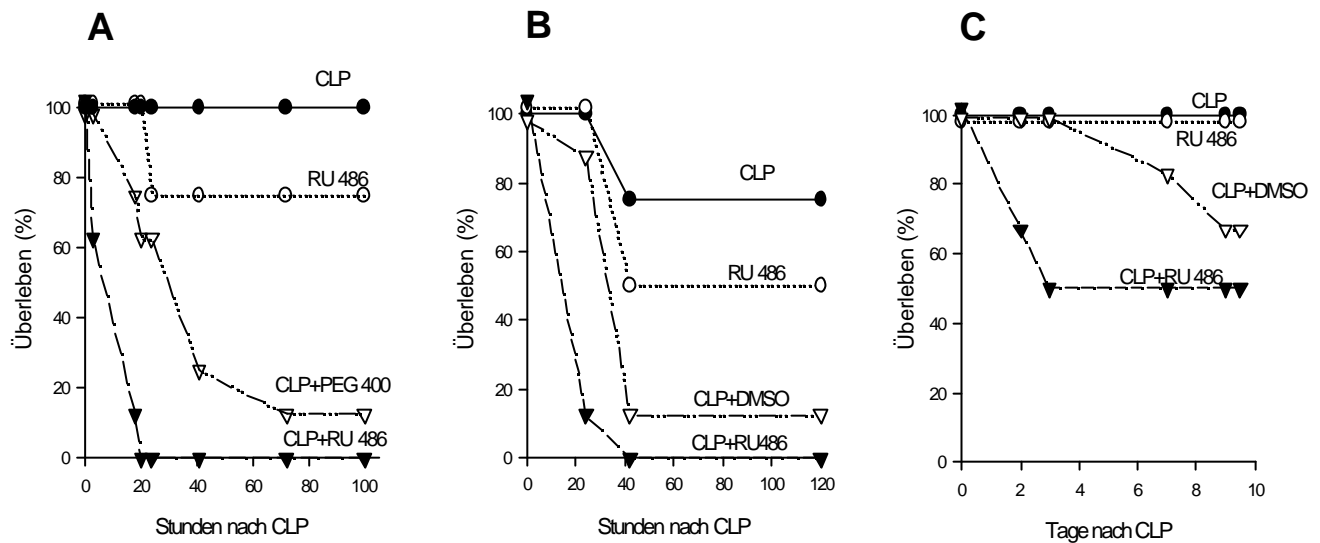


Abbildung 26:
Verträglichkeit von PEG 400 und DMSO als Lösungsmittel für Mifepriston (RU 486) in vivo.

Gleichzeitig zur subletalen CLP wurde Mäusen 50 µg/g Mifepriston (?) (jeweils n = 6) oder nur Lösungsmittel (▽) (jeweils n = 6) i.p. injiziert. Als Lösungsmittel wurden **A** 200 µl PEG 400 (CLP+PEG : CLP+RU486: P = 0,0075), **B** 200 µl DMSO (CLP+PEG : CLP+RU486: P = 0,0268) und **C** 20 µl DMSO (CLP+PEG : CLP+RU486: P = 0,4059) verwendet. Als Kontrolle dienten Mäuse, die nur eine CLP (?) (jeweils n = 4) oder Mifepriston (?) (jeweils n = 4) bekommen hatten.

Obwohl der Unterschied zwischen den immunparalisierten Mäusen, die entweder mit dem gelösten Mifepriston oder mit 200 µl der Lösungsmittel Polyethylenglykol 400 (PEG 400) (Abb. 26 A; P = 0,0075) und Dimethylsulfoxid (DMSO) (Abb. 26 B; P = 0,0268) behandelt wurden, signifikant war, waren die Lösungsmittel in dieser Dosis toxisch und deswegen nicht für weitere Versuche verwendbar. Durch eine Dosisreduzierung von DMSO auf 20 µl wurde die Toxizität soweit gesenkt, dass genügend Tiere lange genug überlebten (Abb. 26 C). Aus diesem Grund wurde für die weiteren Experimente mit Mifepriston 20 µl DMSO als Lösungsmittel verwendet.

4.8.2. Die unmittelbaren Auswirkungen der Inhibition der Glucocorticoide gleichzeitig zur CLP

Es sollte untersucht werden, welche Rolle die Gegenspieler von MIF, die Glucocorticoide, bei der Sepsis-bedingten SIRS spielen. Dazu wurde gleichzeitig zur CLP die Glucocorticoidrezeptoren durch Mifepriston blockiert und die Überlebensrate bestimmt. Zur genaueren Untersuchung des Einflusses von Mifepriston auf die Mortalitätsrate nach CLP wurden zwei unterschiedlich starke CLPs durchgeführt (Abb.27).

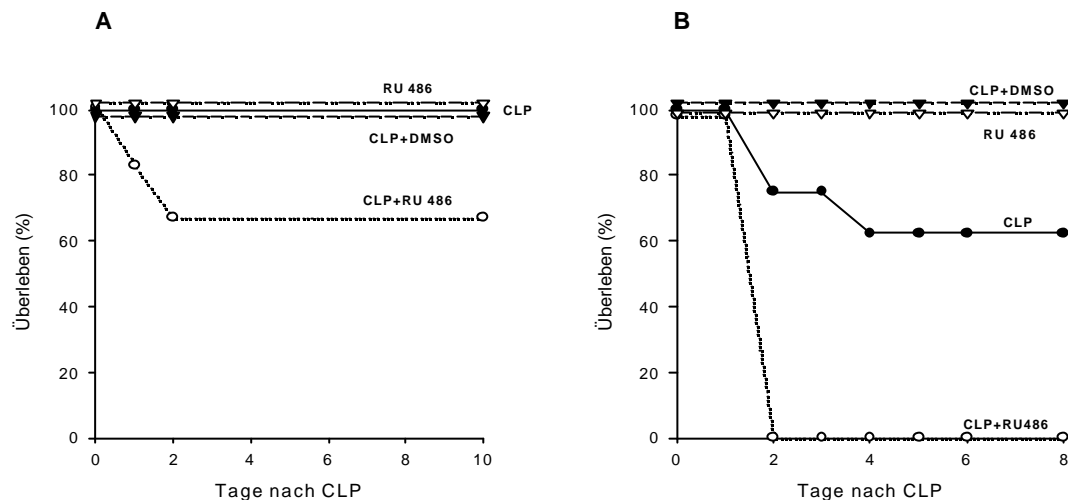


Abbildung 27:

Applikation von Mifepriston gleichzeitig zur CLP erhöht Mortalitätsrate.

Mäusen wurde gleichzeitig zur CLP 50 µg/g Mifepriston (RU 486) (?) (**A** n = 6; **B** n = 8) bzw. 20 µl DMSO (?) (**A** n = 6; **B** n = 8) i.p. appliziert. Die CLP wurde mit **A** 30 %-iger (CLP+DMSO : CLP+RU486: P = 0,1385) und **B** 50 %-iger Ligation (CLP+DMSO : CLP+RU486: P = 0,0001) des Blinddarms und einer Punktion mit jeweils einer 0,4 mm Kanüle durchgeführt. Als Kontrolle dienten Mäuse, die nur eine CLP (?) (**A** n = 4; **B** n = 8), oder Mifepriston (▽) (jeweils n = 4) bekommen hatten.

Die Blockade der Glucocorticoidrezeptoren zum Zeitpunkt der CLP schadete den Tieren, was sich an der erhöhten Sterblichkeit der mit Mifepriston und CLP behandelten Mäuse im Gegensatz zur Lösungsmittel-Kontrollgruppe zeigte (Abb. 27 A). Alle Tiere aus den Kontrollgruppen überlebten, wohingegen 33 % der mit CLP und Glucocorticoid-Rezeptorantagonisten therapierten Mäuse starben. Dennoch war der Unterschied nicht signifikant (P = 0,1385).

Um zu testen, ob durch einen härteren Eingriff die schädliche Wirkung von Mifepriston deutlicher wird, wurde statt einer 30 %-igen Ligation eine 50 %-ige durchgeführt (Abb. 26 B). In diesem Experiment konnte man eine signifikante Verschlechterung (P = 0,0001) der Überlebensrate der Mäuse, bei denen die Wirkung der Glucocorticoide zum Zeitpunkt der

CLP inhibiert wurde, beobachten. Von diesen Tieren starben alle innerhalb von 2 Tagen, wohingegen alle Mäuse der Kontrollgruppe überlebten. Die Härte des Eingriffs spiegelte sich in der Sterblichkeitsrate von 33 % in der CLP-Gruppe wieder.

Ein wichtiger Grund für die erhöhten Mortalitätsraten bei der Inhibition der Glucocorticoideffekte zum Zeitpunkt der CLP könnte die Unterdrückung der antiinflammatorischen Antwort sein. Um dies zu testen, wurden die Serumspiegel von Entzündungsmediatoren bei den entsprechend behandelten Mäusen untersucht (Abb. 28).

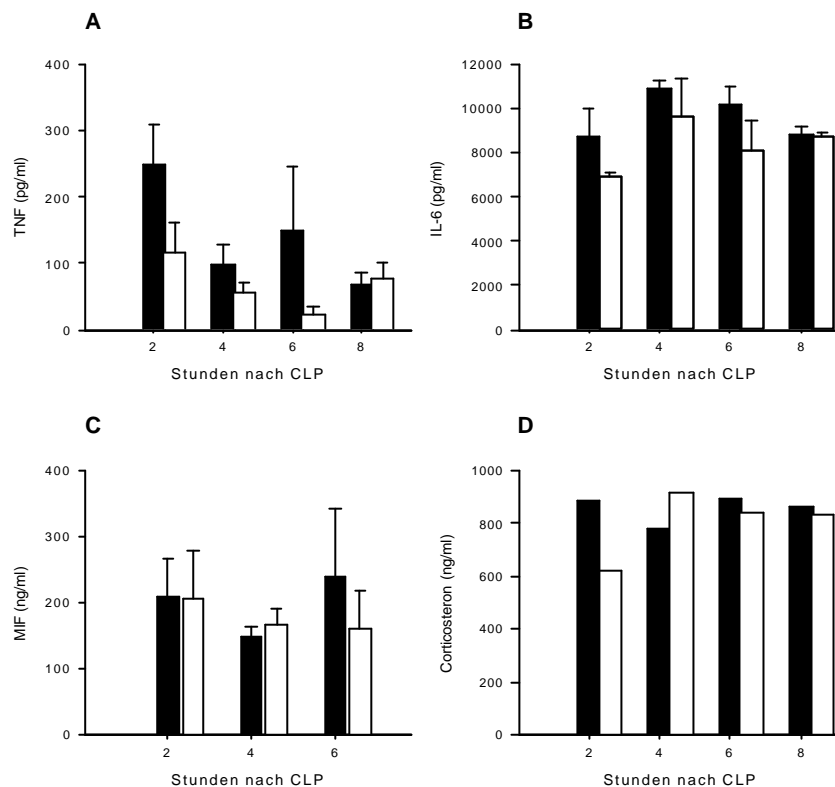


Abbildung 28:
Applikation von Mifepriston gleichzeitig zur CLP erhöht die Serumspiegel von Entzündungsmediatoren.

Mäusen wurde gleichzeitig zur CLP 50 µg/g Mifepriston (RU 486) (schwarze Balken) bzw. 20 µl DMSO (weiße Balken) (jeweils für jeden Zeitpunkt n = 3) i.p. appliziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere geblutet und aus dem Serum die Werte für **A** TNF (2h: P = 0,100; 4h: P = 0,200; 6h: P = 0,100), **B** IL-6 (2h: P = 0,100), **C** MIF und **D** Corticosteron (Proben für gleiche Zeitpunkte wurden vereint, deswegen waren keine statistischen Aussagen möglich) bestimmt.

Durch die Gabe von Mifepriston gleichzeitig zur CLP kam es zu einer deutlichen Erhöhung der TNF-Serumspiegel in den ersten 6 Stunden (Abb. 28 A). Vor allem die Zeitpunkte 2 und 6 Stunden nach CLP zeigten einen Unterschied in der TNF-Serumkonzentration im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle. 8 Stunden nach der Behandlung war der Effekt

aufgehoben, da die TNF-Spiegel der Mifepriston-Gruppe und der Kontrollgruppe gleich hoch waren.

Die Konzentration von IL-6, eines weiteren wichtigen proinflammatorischen Zytokins, änderte sich aufgrund der Behandlung mit Mifepriston nicht so stark, wie dies bei TNF der Fall war (Abb. 28 B). Aber auch bei IL-6 zeigte sich eine Erhöhung der Serumspiegel nach Blockade der Glucocorticoidrezeptoren zum Zeitpunkt der CLP in den ersten 6 Stunden, wobei ebenfalls die Zeitpunkte 2 und 6 Stunden nach CLP die größten Unterschiede zur Kontrollgruppe aufwiesen. 8 Stunden nach der Applikation ließ sich, genau wie bei TNF, keine Wirkung von Mifepriston auf die IL-6-Werte mehr feststellen.

Die Serumspiegel von MIF wurden durch die Inhibition der Glucocorticoidwirkung kaum beeinflusst (Abb. 28 C).

Die Konzentration von Corticosteron wurde durch die Blockade der Glucocorticoidrezeptoren ebenfalls kaum beeinträchtigt (Abb. 28 D). Lediglich in der frühen Phase der Hemmung der Glucocorticoidwirkung kam es zu einer leichten Erhöhung der Spiegel von Corticosteron im Vergleich zur Kontrollgruppe. 4 Stunden nach CLP war dieser Effekt schon wieder vorbei.

4.8.3. Die Auswirkungen der Inhibition der Glucocorticoidwirkung gleichzeitig zur CLP auf die Immunparalyse

Da die Neutralisation von MIF zum Zeitpunkt der CLP die Empfindlichkeit für Superinfektionen erniedrigt (Abb. 22), stellte sich die Frage, welche Auswirkungen die Blockade der Glucocorticoidrezeptoren gleichzeitig zur CLP auf diesen Immunparalyseparameter hat. Zu diesem Zweck wurde Mäusen gleichzeitig zur subletalen CLP Mifepriston appliziert und 2 Tage später wurden die überlebenden Tiere mit *S. tm.* superinfiziert (Abb. 29).

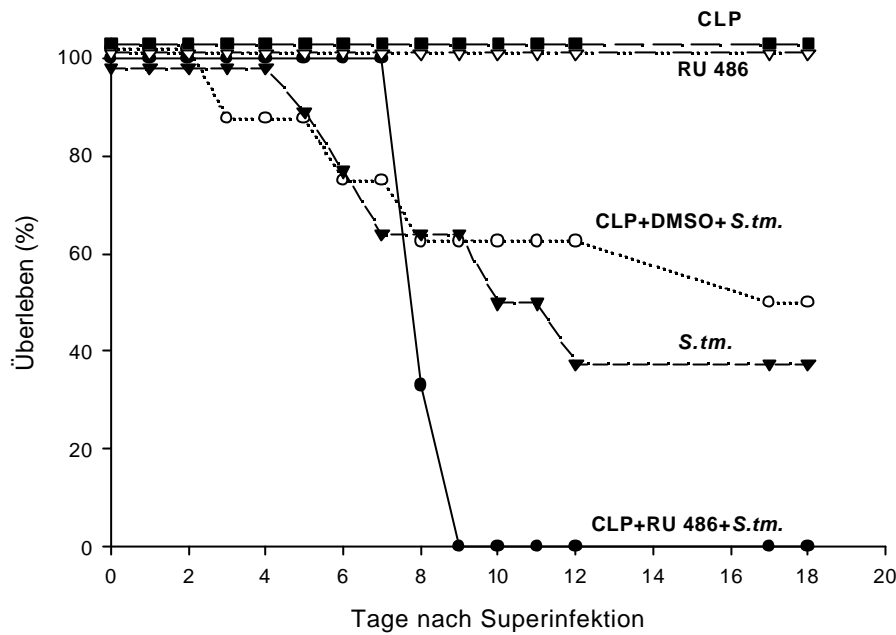


Abbildung 29:
Inhibition der Glucocorticoidwirkung zum Zeitpunkt der CLP erhöht die Anfälligkeit für Superinfektionen.

Mäusen wurde gleichzeitig zur subletalen CLP 50 µg/g Mifepriston (RU 486) (?) (n = 8) bzw. 20 µl DMSO (?) (n = 3) i.p. appliziert. 2 Tage später wurden die Tiere mit $1,25 \times 10^4$ *S.tm.* i.p. infiziert (CLP+DMSO : CLP+RU486: P = 0,2767). Als Kontrolle dienten Mäuse, die nur eine CLP (!) (n = 2), Mifepriston (∇) (n = 2), oder Bakterien (?) (n = 8) bekommen hatten.

Die gleichzeitige Blockade der Glucocorticoidrezeptoren zur CLP führte zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Superinfektionen. Zwar starben die ersten Mäuse aus der CLP- und Mifepriston-Gruppe später als aus der CLP- und Lösungsmittel-Gruppe an den Folgen der Infektion mit *S.tm.*, dafür überlebte aber auch kein Tier das Experiment. Dagegen lebten noch 50 % der Tiere aus der Kontrollgruppe am Ende des Versuchs. Die eingesetzte Menge an *Salmonellen* war hoch, da 62,5 % der gesunden Mäuse nur aufgrund der Infektion starben.

Ein weiteres Kennzeichen der Immunparalyse ist die Unfähigkeit zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. Um zu testen, ob die Hemmung der Glucocorticoide zum Zeitpunkt der CLP auch in diesem Parameter zu einer Verstärkung des immunparalytischen Zustands führt, wurden die Zytokinspiegel der entsprechend behandelten Mäuse untersucht (Abb. 30).

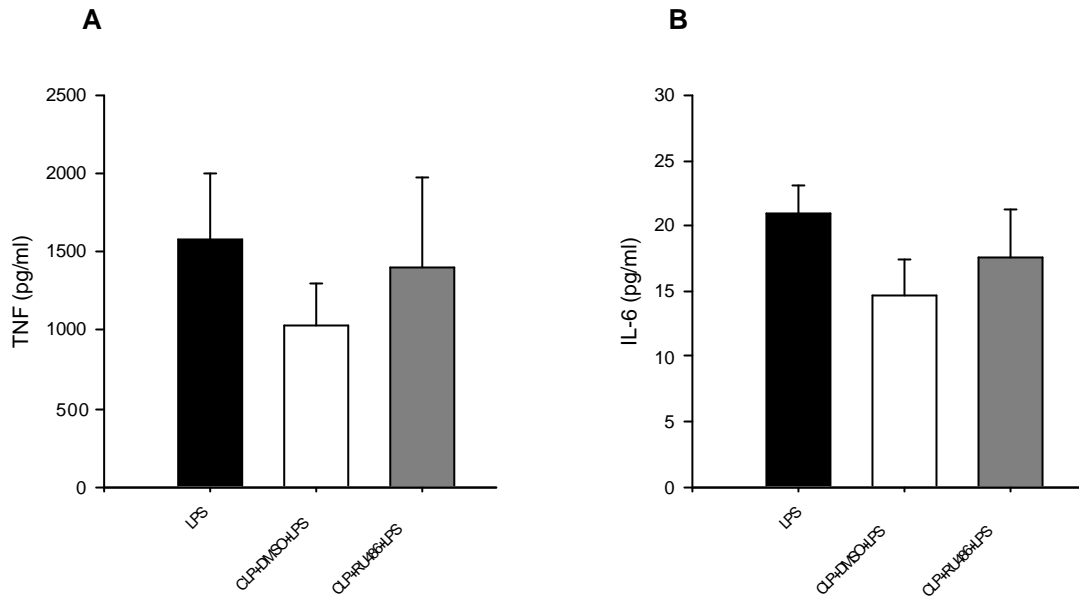


Abbildung 30:

Inhibition der Glucocorticoidwirkung zum Zeitpunkt der CLP hat keinen Einfluss auf das Immunparalysekennzeichen Zytokin Produktionsfähigkeit.

Mäusen wurde gleichzeitig zur subletalen CLP 50 µg/g Mifepriston (RU 486) (graue Balken) bzw. 20 µl DMSO (weiße Balken) (jeweils n = 3) i.p. appliziert. 2 Tage später wurden die Tiere mit 1 µg LPS stimuliert und 90 Minuten später geblutet. Aus dem Serum wurden die Werte für **A** TNF (gesunde Mäuse : CLP+RU486: P = 571; gesunde Mäuse : CLP+DMSO: P = 0,032; CLP+DMSO : CLP+RU486: P = 0,571) und **B** IL-6 (gesunde Mäuse : CLP+RU486: P = 0,393; gesunde Mäuse : CLP+DMSO: P = 0,008; CLP+DMSO : CLP+RU486: P = 0,786) mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle dienten gesunde Mäuse, die nur mit LPS stimuliert worden waren (schwarze Balken) (n = 3).

Die Produktionsfähigkeit von proinflammatorischen Zytokinen war 2 Tage nach CLP und der Applikation von Mifepriston nicht beeinträchtigt. Es kam im Gegenteil sogar zu einer leichten Erhöhung der Produktionsfähigkeit unter der Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonist-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies galt sowohl für TNF (Abb. 30 A), als auch für IL-6 (Abb. 30 B).

4.8.4. Die Auswirkungen der Inhibition der Glucocorticoidwirkung zum Zeitpunkt der Immunparalyse

Da durch die Applikation von rhMIF immunparalytisierte Mäuse vor einer Superinfektion geschützt werden konnten (Abb. 16), sollte überprüft werden, ob durch die Rezeptorblockade des antiinflammatorischen Gegenspielers von MIF, der Glucocorticoide, die gleiche Wirkung erzielt werden kann. Dafür wurden immunparalytisierte Mäuse kurz vor der Superinfektion mit Mifepriston behandelt (Abb. 31).

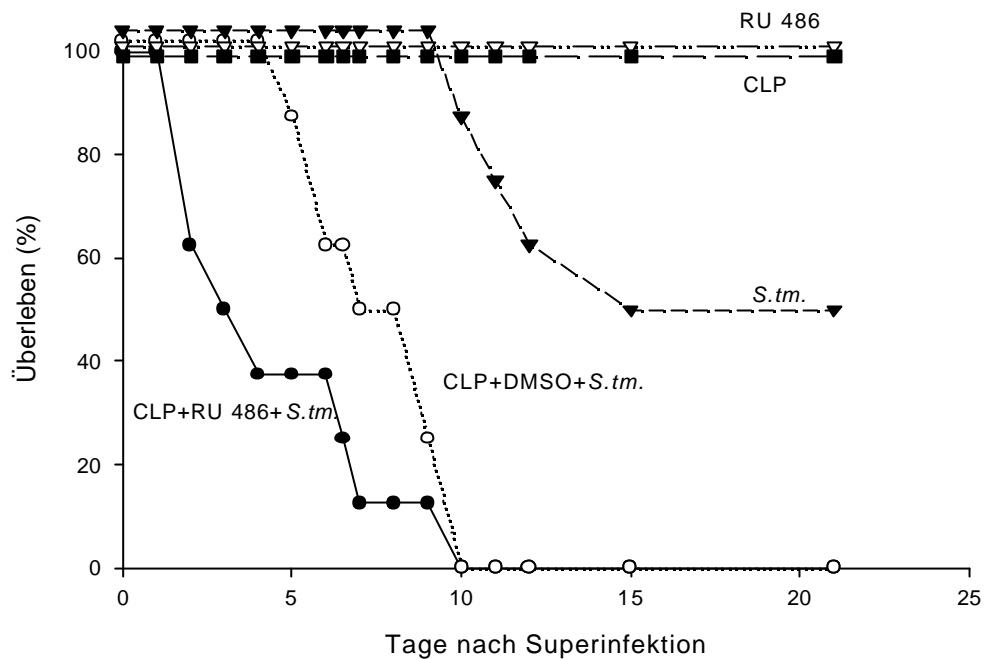


Abbildung 31:

Die Inhibition der Glucocorticoidwirkung während der Immunparalyse schadet im Superinfektionsmodell.

2 Tage nach subletaler CLP wurde Mäusen 50 µg/g Mifepriston (RU 486) (?), bzw. 20 µl DMSO (?) i.p. injiziert (jeweils n = 8). 1 Stunde später wurden sie mit $6,25 \times 10^3$ *S.tm.* infiziert (CLP+RU : CLP+DMSO: P = 0,1256). Als Kontrolle dienten Mäuse, die nur eine CLP (!) (n = 3), Mifepriston (∇) (n = 2), oder Bakterien (?) (n = 8) bekommen hatten.

Auch die Behandlung mit Mifepriston während der Immunparalyse hatte negative Auswirkungen auf das Überleben einer Superinfektion. Die so therapierten Mäuse starben viel eher an der Infektion mit *S.tm.* als die Tiere, die statt Mifepriston DMSO bekommen hatten. Am Ende des Experiments überlebte zwar bei beiden Gruppen keine Maus, dennoch wurde die toxische Wirkung von Mifepriston beispielsweise am Tag 4 nach der Superinfektion deutlich. Zu diesem Zeitpunkt lebten noch 100 % der mit DMSO behandelten Tiere, wohingegen schon 62,5 % der Mäuse tot waren, die Mifepriston appliziert bekommen hatten.

4.9. Einfluss der MIF-Spiegel auf den Krankheitsverlauf der humanen Sepsis

Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass MIF im Blut von Sepsispatienten im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht ist (Beishuizen, 2001, Bozza, 2004, Calandra, 2000, Gando, 2001, Lehmann, 2001). Hier wurde untersucht, ob sich die MIF-

Konzentration während des Krankheitsverlaufs ändert und ob aus den Plasmaspiegeln von MIF Rückschlüsse auf das Überleben gezogen werden können.

4.9.1. Verlauf der MIF-Plasmaspiegel während der Sepsis

Zu den Zeitpunkten 1, 4 und 11 Tage nach der Einlieferung auf die Intensivstation mit der Diagnose Sepsis wurde den Patienten Blut abgenommen. Aus den Proben wurde die Konzentration von MIF mittels ELISA bestimmt (Abb. 31).

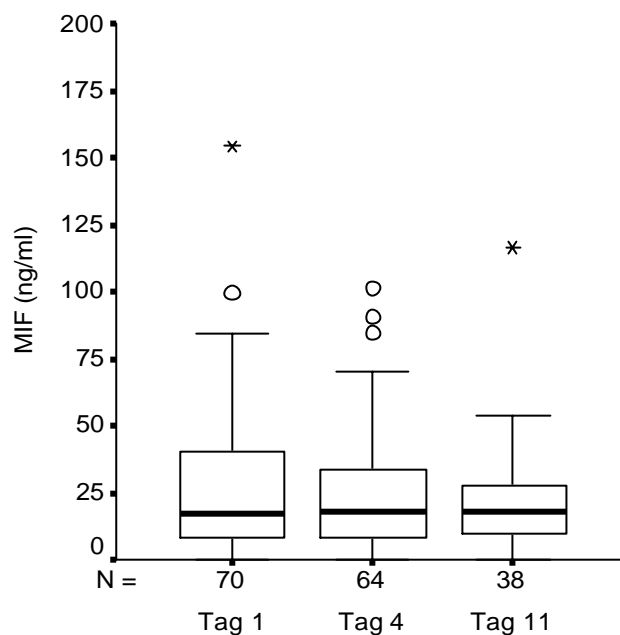


Abbildung 32:

Die MIF Konzentration zu verschiedenen Zeitpunkten einer Sepsiserkrankung.

Patienten wurden zu den Zeitpunkten 1, 4, und 11 Tage Blutproben entnommen. Aus dem Lithium-Heparin-Plasma wurde die Konzentration von MIF bestimmt. Die horizontale Linie ist der Median der jeweiligen Gruppe; Rechtecke symbolisieren 25 % - 75 % Quartiles, N ist die Anzahl der Proben für den jeweiligen Zeitpunkt; (?) und (·) sind Ausreißer.

Die individuellen MIF-Plasmaspiegel waren nicht homogen verteilt und streuten stark.

Dennoch konnte man anhand des Medians der Gesamtheit aller Proben erkennen, dass zu den 3 verschiedenen Zeitpunkten sich die MIF Konzentration im Krankheitsverlauf nicht änderte. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass zu den späteren Zeitpunkten (Tag 4 und 11) nicht mehr alle Patienten erfasst worden sind, da einige bereits verstorben waren.

Auch die mediane MIF Konzentration von gesunden Probanden unterschied sich mit 14,525 ng/ml kaum von den Werten der Sepsispatienten.

4.9.2. Korrelation zwischen MIF-Plasmaspiegel und Überleben der Sepsis

Um zu überprüfen, ob es einen Zusammenhang zwischen erhöhten MIF-Konzentrationen und der Sterblichkeit gibt, wurden die Patientenproben in zwei Gruppen, die eine mit hohen, die andere mit niedrigen Konzentration von MIF, unterteilt und der Faktor Überleben untersucht (Abb. 33).

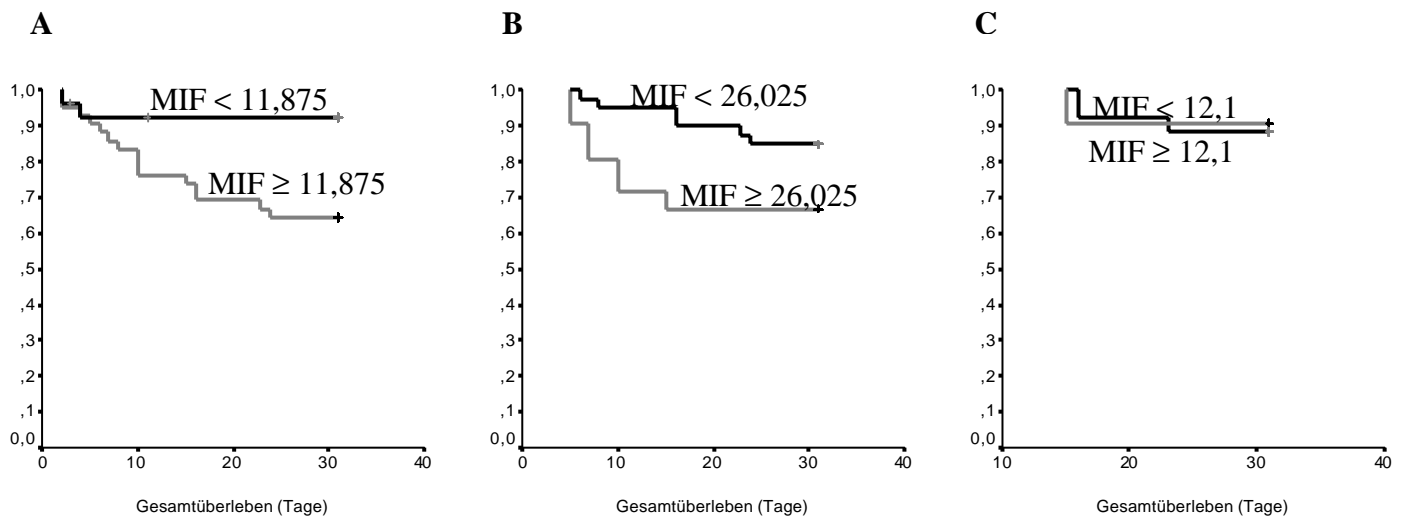


Abbildung 33:

Hohe MIF-Plasmaspiegel korrelieren mit erhöhter Mortalitätsrate zu Beginn der Sepsis.

Das Patientenkollektiv wurde in hohe (graue Linien) und niedrige (schwarze Linien) MIF-Plasmaspiegel unterteilt und die Überlebensrate zu den Zeitpunkten **A** Tag 1 und dem Schwellenwert 11,875 ng/ml, **B** Tag 4 und dem Schwellenwert 26,025 ng/ml, und **C** Tag 11 und dem Schwellenwert 12,1 bestimmt.

Durch AUROC (Areas under the Receiver operating characteristic curves) -Berechnungen wurde die Vorhersagekraft der MIF-Plasmaspiegel zu den jeweiligen Zeitpunkten für eine erhöhte Sepsismortalität bestimmt. Die optimalen Schwellenwerte wurden aus den maximalen Werten der Produkte von Spezifität und Sensitivität berechnet (Tabelle 1). Kurz nach der Sepsisdiagnose, also zum Zeitpunkt 1, korrelierten hohe MIF-Konzentrationen mit einer signifikanten Erhöhung der Mortalität dieser Patienten (Abb. 33 A). Das Sterberisiko der Patienten mit hohen MIF-Plasmaspiegeln war fast fünfmal höher als bei der anderen Gruppe, in der die Patienten weniger als 11,875 ng/ml MIF im Plasma hatten. Bereits 4 Tage nach der Diagnose war dieser Zusammenhang nicht mehr so stark

erkennbar und auch nicht mehr signifikant (Abb. 33 B). Nach 11 Tagen war überhaupt kein Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen festzustellen (Abb. 33 C).

Time point	I ^b	II ^b	III ^b
Cutoff value	11,875 ng/ml	26.025 ng/ml	12.1 ng/ml
Sensitivity ^c	0.889	0.583	0.750
Specificity ^c	0.529	0.286	0.697
Area under ROC curve	0.664	0.647	0.318
95% confidence interval	0.522-0.806	0.486-0.809	0.141-0.495
<i>P</i> (asymptotic significance) ^d	0.040	0.095	0.240

Tabelle 1: Berechnung der Vorhersagekraft von MIF für erhöhte Mortalität mit der AUROC-Methode.

a AUROC, area under the receiver operating characteristic curve

b I: day 1 after admission to the ICU; II, day 4; III, day 11;

c sensitivity and specificity were calculated for the cutoff, which represented the best discrimination as derived from the ROC curves;

d bold face representing data with *P* values < 0.05; H0: AUROC=0.5.

5. Diskussion

5.1. Die Rolle von MIF bei gesunden Mäusen

In dieser Arbeit wurden die Mäuse mit rekombinantem humanen MIF (rhMIF) behandelt. Das rekombinante Material hatte das korrekte Molekulargewicht (Bernhagen, 1994) und wies keine Verunreinigungen auf (Abb. 4). Es zeigte ebenfalls enzymatische Tautomeraseaktivität (Abb. 5), eine für MIF typische biologische Aktivität (Zhang, 1995). Durch diese Untersuchungen wurde sichergestellt, dass es sich bei dem gelieferten Protein auch wirklich um MIF handelte und dass es biologisch noch voll funktionsfähig war.

Der Einsatz von humanem MIF bei der Maus ist unproblematisch, da die Wirkung von humanem und murinem MIF in der Maus identisch ist. So wurde humanes MIF genauso erfolgreich wie murines MIF zur Bekämpfung von *Leishmania major*-Infektionen bei murinen Makrophagen eingesetzt (Juttner, 1998). Ein weiteres wichtiges Indiz für den Erhalt der Wirkung von humanem MIF bei Mäusen ist die Ähnlichkeit von menschlichem und murinem MIF, die sich in einer über 90 %-igen Homologie in der Primärsequenz zeigt (Bernhagen, 1994).

Die Applikation von hohen Dosen an rekombinatem MIF (10 – 50 mg pro kg Tier) bei gesunden Mäusen führte zwar zu sichtbaren Anzeichen einer Endotoxämie, nicht aber zum Tod der Tiere (Bernhagen, 1993). Erst die Kombination von MIF mit LPS erhöhte die Mortalitätsrate der Mäuse im Vergleich zu nur mit LPS behandelten Tieren. Dies bedeutet, dass die Gabe selbst sehr großer Mengen an exogenem MIF nicht tödlich für die Tiere war. Dagegen wirkt TNF in hohen Dosen letal (Kettelhut, 1987). Darum ist der Einsatz von MIF zur Immunmodulation im Tierexperiment weniger gefährlich als der von TNF.

Die in dieser Arbeit gewählte Menge von 20 µg rhMIF pro Maus führte bei den Tieren zu keiner äußerlich sichtbaren Veränderung. Dies war auch zu erwarten, da die verwendete Menge an MIF deutlich unter der Dosis lag, welche die endotoxämischen Symptome hervorrief (Bernhagen, 1993). Die Wirkung von rhMIF auf die Mäuse zeigte sich erst durch die Blutuntersuchung. Die exogene Applikation von rhMIF führte zu einer Erhöhung von Entzündungsmediatoren (Abb. 7). Obwohl sie antiinflammatorisch wirken, zählen auch die

Glucocorticoide zu den Entzündungsmediatoren, da sie zur Gegenregulation bei einer Entzündung ausgeschüttet werden (Smoak, 2004). Die Ergebnisse deckten sich mit den bereits publizierten Daten, dass MIF die Freisetzung von TNF und Stickoxid induziert (Bernhagen, 1994, Calandra, 1995). Weiterhin war auch schon bekannt, dass Glucocorticoide dosisabhängig die Sezernierung von MIF stimulieren (Calandra, 1995), so dass sich der umgekehrte Fall leicht erklären lässt. RhMIF wirkt also auch bei der Maus als proinflammatorisches Protein, da es zu einer Erhöhung von Entzündungsparametern kommt.

Die Neutralisation von MIF durch polyklonale Antikörper in gesunden Mäusen führte zu keiner Änderung in den Konzentrationen von Entzündungsmediatoren. Zwar wird durch die Antikörper das konstitutiv im Blut vorhandene MIF (Metz, 1997) abgefangen, aber da keine Entzündung induziert wurde, spiegelt sich das Fehlen eines wichtigen proinflammatorischen Faktors nicht in den Werten der Entzündungsmediatoren wieder (Abb. 8). Dies stimmt auch mit der Tatsache überein, dass unbehandelte MIF-defiziente Mäuse keinen Phänotyp haben (Bozza, 1999).

Die Neutralisation von MIF in gesunden Mäusen bewirkte eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber subletalen Infektionen. Mäuse, denen Antikörper gegen MIF vor einer Belastung mit einer subletalen Menge an *S.tm.* oder *P.a.* appliziert wurden, hatten eine erhöhte Mortalitätsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 9). Den Tieren fehlten die durch MIF vermittelten Eigenschaften, wie Erhöhung der Phagozytoserate und Ausschüttung vieler proinflammatorischer Produkte, die sie zur Abwehr von Infektionen benötigt hätten (Bacher, 1996, Bernhagen, 1994, Calandra, 1995, Mitchell, 1999). Dieses Ergebnis bestätigt andere Veröffentlichungen, in denen MIF für die Abwehr von *Leishmania major* notwendig ist und MIF-knock-out-Mäuse eine Infektion mit *Salmonella typhimurium* nicht kontrollieren können (Juttner, 1998, Koebernick, 2002, Xu, 1998).

Exogenes MIF hatte keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit von gesunden Mäusen gegenüber subletalen Infektionen. Die Injektion von 20 µg rhMIF vor einer subletalen Infektion brachte keinen Überlebensvorteil (Abb. 10). Die gesunden Mäuse konnten mit Hilfe ihres intakten Immunsystems die Erreger gut bekämpfen. Die zusätzliche Applikation eines endogen ausreichend vorhandenen proinflammatorischen Proteins zeigte hier keine Wirkung. In einer Veröffentlichung konnte gezeigt werden, dass höhere Dosen von MIF (50 µg) die Letalität einer *E.coli*-Peritonitis erhöhen (Calandra, 2000). Dies hebt die Toxizität der Kombination von MIF und einer Infektion, sowie von MIF und LPS bei gesunden Mäusen hervor, was zuvor schon in Modellen des endotoxischen und

septischen Schocks gezeigt wurde (Bernhagen, 1993, Calandra, 2000). Der positive Effekt, die verbesserte Erregerabwehr, wurde in diesen Fällen von einer Hyperinflammation, die das exogene MIF durch zusätzlich Sekretion von systemischen Zytokinen auslöste, überdeckt. Als Folge der überschießenden Entzündung starben die Tiere am Schock. Der Grund, warum die Tiere in Abb. 10 keinen Nachteil durch die Applikation von rhMIF hatten, ist, dass sie, im Vergleich zu den anderen Veröffentlichungen, eine geringere Dosis erhielten und somit nicht in einen Schockzustand gerieten.

5.2. Die Auswirkungen der CLP auf das Immunsystem

In dieser Arbeit wurde die Rolle von MIF in der sepsisbedingten Immunparalyse untersucht. Als etabliertes Tiermodell wurde die zökale Ligation und Punktion (CLP) eingesetzt. Durch die CLP kommt es zu einer Abszessbildung und einem Übertritt von verschiedenen Darmbakterien in den gesamten Organismus der Maus, was wiederum eine systemische Entzündungsreaktion zur Folge hat (Echtenacher, 2001). Damit spiegelt die CLP gut die Verhältnisse einer multibakteriellen Sepsis beim Menschen wieder, die meistens auch von einer lokal begrenzten Infektion in eine generalisierte Bakteriämie mit systemischer Hyperinflammation übergeht.

Um den Immunstatus nach CLP zu bestimmen, wurden Kinetiken der Serumwerte von immunologisch wichtigen Mediatoren nach CLP erhoben (Abb. 11). Generell wurde ein schneller Anstieg (innerhalb der ersten 6 Stunden) der Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen und Corticosteron nach CLP festgestellt. Die Geschwindigkeit und das Ausmaß der anschließenden Reduktion unterschieden sich bei allen Faktoren deutlich.

Die TNF-Spiegel änderten sich nach der CLP nur wenig. Dies lässt sich mit den geringen Mengen an freigesetztem TNF nach CLP erklären, die an der unteren Detektionsgrenze lagen. Um die wahren Verhältnisse der TNF-Konzentration messen zu können, muss man die Sekretion aus den Zellen mit LPS stimulieren (siehe Abb. 12). Dennoch konnte beobachtet werden, dass die TNF-Spiegel während der ersten 24 Stunden nach CLP anstiegen und dann wieder auf das Ausgangsniveau zurückfielen. Dies deckt sich mit der Veröffentlichung von Walley et al. (Walley, 1996), in welcher die TNF-Konzentration nach CLP im Vergleich zur Kontrollgruppe, die nur laparotomiert wurde, während der ersten 24 Stunden anstieg und nach 48 Stunden auf den Ausgangswert zurückfiel.

Deutlicher wurde die starke Entzündungsreaktion nach CLP durch die IL-6-Kinetik. Es kam zu einem starken und schnellen Anstieg der Konzentration von IL-6 während der ersten 6 Stunden, die dann aber fast ebenso schnell auch wieder abfiel. Ein ähnlicher Verlauf der IL-6-Spiegel nach CLP wurde auch in C 57 Black 6 Mäusen, mit einer hohen Konzentration nach 6 Stunden und anschließendem Absinken bis auf den Wert 0 nach 20 Stunden, beobachtet (Torres, 2005). IL-6 ist in der Klinik ein wichtiger Entzündungsmarker. Es besitzt gegenüber TNF den Vorteil, dass es in höherer Konzentration nach einer Entzündung im Serum vorhanden und somit leichter zu detektieren ist. TNF ist zwar einer der ersten Mediatoren in einer akut-entzündlichen Erkrankung und induziert IL-6, dennoch wird die Bioaktivität von TNF schnell durch natürliche Antagonisten und lösliche TNF-Rezeptoren reduziert (Bruunsgaard, 2001).

Auch die Konzentration von MIF stieg während der ersten 6 Stunden stark an. Da die Sekretion von MIF durch Bakterien und bakterielle Bestandteile induziert wird (Calandra, 1994, Calandra, 1998), wurden ähnliche Konzentrations-Zeit-Kurven nach CLP wie bei anderen proinflammatorischen Zytokinen gefunden. Unterschiedlich war, dass nach 24 Stunden die MIF-Konzentration unterhalb des Ausgangsniveaus der gesunden Mäuse lag und dort auch während der folgenden zwei Tage blieb. Das bedeutet, dass ein Mangel an MIF ebenfalls ein Symptom der Immunparalyse sein kann, da die reduzierte MIF-Konzentration mit der immunparalytischen Phase zusammenfällt.

Die Gegenregulation der starken Entzündung durch das antiinflammatorische Corticosteron verlief parallel zu den proinflammatorischen Zytokinen mit einem steilen Anstieg der Konzentration in den ersten Stunden nach der CLP. Die Reduktion der Konzentration des Corticosterons dauerte viel länger als bei den proinflammatorischen Zytokinen. Dies kann mit der fortlaufenden Entzündung und der damit verbundenen Gegenmaßnahmen des Organismus erklärt werden (Smoak, 2004).

Für die genaue Bestimmung der TNF-Werte und, da die Unfähigkeit, auf Stimulation hin TNF zu produzieren, ein Kennzeichen der Immunparalyse ist (Volk, 1991), wurden die LPS-stimulierten-Serumspiegel, auch Produktionskapazität genannt, bestimmt (Abb. 11). Die TNF-Werte blieben in den ersten 8 Stunden nach CLP konstant. Danach fielen sie kontinuierlich innerhalb von 24 Stunden auf weniger als die Hälfte des Ausgangswerts ab und verblieben dort während der folgenden 2 Tage, ehe sie langsam wieder anstiegen. Dies bedeutet, dass die Tiere von Tag 1 bis Tag 3 kaum in der Lage waren, trotz der starken Stimulierung mit LPS TNF zu produzieren. Während dieser Zeitspanne waren die Tiere im Zustand der „Immunparalyse“, da mit TNF ein wichtiges Zytokin für die Abwehr

von Infektionen fehlte und die Mäuse somit anfälliger für den Befall von Krankheitserregern waren (Echtenacher, 2003).

Was die anderen drei Parameter (IL-6, MIF und Corticosteron) betrifft, änderten sich deren Konzentrationen über die Zeit nicht. Das heißt, sie konnten während des gesamten Zeitraums nach der CLP induziert werden und ihre Produktion war nicht gehemmt.

5.3. Die Auswirkungen der Immunparalyse auf den Organismus

Die Immunparalyse ist der Extremfall einer Suppression des Immunsystems (Thiel, 2000). Der Organismus besitzt in diesem Zustand überhaupt keine Abwehrmechanismen gegenüber Fremdstoffen und die Gefahr, an einer lebensbedrohlichen Infektion zu erkranken, ist sehr groß. Die absolute Lähmung des Immunsystems, wie sie für die Immunparalyse beschrieben wird, ist schwer von einer „normalen“ Immunsuppression zu unterscheiden, da die Übergänge fließend sind und viele Kennzeichen bei beiden zu finden sind. In dieser Arbeit wurden trotzdem alle Mäuse zum Zeitpunkt 2 Tage nach CLP als „immunparalysierte Tiere“ bezeichnet.

Die Immunparalyse zeichnet sich durch eine erhöhte Empfindlichkeit und Sterblichkeit bei Infektionen aus (Kox, 2000). In Abb. 13 kann man deutlich erkennen, dass die CLP die Tiere so geschwächt hat, dass sie 2 Tage später die Infektion nicht mehr wirkungsvoll bekämpfen konnten. Die Mäuse waren, bedingt durch den vorherigen Eingriff, zu diesem Zeitpunkt in einem immunparalytischen Zustand, da weder die CLP noch die Infektion mit Bakterien für sich allein tödlich war, sondern nur die Kombination zu einer erhöhten Mortalitätsrate der Tiere führte.

Ein weiteres Merkmal der Immunparalyse ist die reduzierte Fähigkeit, auf einen Stimulus hin TNF zu produzieren (Volk, 1991). Dies konnte im Mausmodell für den Zeitraum von Tag 1 bis 3 nach CLP festgestellt werden (Abb. 12 A).

Die Unfähigkeit des Immunsystems, während der Immunparalyse eine Infektion zu kontrollieren, zeigt sich auch an der Anzahl der Bakterien. Konnte man 20 Stunden nach intranasaler Infektion mit *P.a.*, einem für Mäuse nicht-pathogenen Keim, in den Lungen der gesunden Mäuse keine Bakterien mehr finden, so waren sie in den immunparalysierten Tiere noch zahlreich vorhanden (Abb. 14).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine für gesunde Mäuse harmlose Infektion für immunparalytische Mäuse tödlich endet, da ihr Immunsystem nicht adäquat auf die Erreger reagieren kann und diese sich somit ungehindert im Organismus verbreiten können.

5.4. Die Rolle von MIF in der Immunparalyse

Die Neutralisation von MIF während der Immunparalyse führt zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Sekundärinfektionen durch eine Reduktion der Entzündungsbereitschaft.

Die erhöhte Empfindlichkeit der mit Antikörper gegen MIF behandelten immunparalisierten Mäuse gegenüber Infektionen zeigte sich sowohl bei der Belastung mit *P.a.* als auch mit *S.tm.* (Abb. 15). Die beiden Keime unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Pathogenität für die Tieren deutlich. *S.tm.* ist im Gegensatz zu *P.a.* ein typisches mauspathogenes Bakterium. Dies spiegelte sich in der Überlebensrate der gesunden Mäuse wieder, da alle eine Infektion mit *P.a.* überlebten, wohingegen 30 % an den Folgen der *S.tm.*-Belastung starben. Durch die Verwendung der *Pseudomonaden* sollte das Problem der nosokomialen Infektion von immunparalisierten Patienten auf der Intensivstation simuliert werden, da *P.a.* häufig der Auslöser dieses Phänomens ist (Astal, 2004).

Die erhöhte Empfindlichkeit der immunparalisierten Mäuse durch die Behandlung mit Antikörpern gegen MIF widerspricht der Datenlagen bei gesunden Mäusen, da bei ihnen die Neutralisation von MIF vor den Folgen eines septischen und endotoxischen Schocks geschützt hatte (Bernhagen, 1993, Calandra, 2000). Dieser Schutz wurde durch die Verhinderung des Schockzustands bei den Mäusen erreicht, da mit dem Abfangen von MIF durch Antikörper die Wirkung eines wichtigen proinflammatorischen Faktors aufgehoben wurde. Bei der Immunparalyse liegt eine andere Ausgangssituation vor. In diesem Zustand ist die Gefahr, einen Schock aufgrund einer Hyperinflammation zu erleiden, nicht gegeben, da der Organismus sich in einer hypoinflammatorischen Phase befindet (Hoflich, 2002). Durch die Neutralisation von MIF werden die stimulierten Konzentrationen von TNF und IL-6 reduziert (Abb. 24). Dadurch werden dem Organismus, der in der Immunparalyse sowieso nur schwer eine Entzündungsreaktion entwickelt, noch zusätzlich wichtige proinflammatorische Faktoren entzogen. Die Inflamationsreaktion ist aber wichtig für die Bekämpfung von Infektionen. Deswegen schadet die Behandlung mit Antikörpern gegen MIF den immunparalisierten Mäusen. Ihre sowieso schon geschwächten Abwehrmechanismen gegenüber einer Infektion werden dadurch noch mehr unterdrückt.

Da es sich gezeigt hatte, dass die Neutralisation von MIF im Zustand der Immunparalyse schadet, war es wichtig, zu testen, ob die Applikation von exogenem MIF die immunparalisierten Tiere im Superinfektionsmodell schützt. Mit der intraperitonealen Injektion von 20 µg rhMIF wurde die Empfindlichkeit der immunparalisierten Mäuse

gegenüber Sekundärinfektionen durch eine Erhöhung der Entzündungsbereitschaft gesenkt.

Die schützende Wirkung von MIF wurde für Sekundärinfektionen mit *P.a.*, *S.tm.* und *L.m.* nachgewiesen (Abb. 16). Mit *L.m.* wurde ein weiterer Keim zur Infektion der immunparalisierten Tiere getestet, um zu überprüfen, ob die Schutzfunktion von MIF auch für grampositive Bakterien zu beobachten ist. Durch die Injektion von MIF konnte hier ebenfalls ein signifikanter Überlebensvorteil erreicht werden. Das bedeutet, dass MIF sowohl vor einer Infektion mit gramnegativen als auch grampositiven Bakterien im Zustand der Immunparalyse schützt. Die Applikation von MIF könnte somit eine mögliche Therapieform zur Prävention von nosokomialen Infektionen für immunparalysierte Patienten sein.

Den Schutz, den rhMIF vor Sekundärinfektion in immunparalisierten Mäusen induziert, wird durch eine Erhöhung von bioaktiven proinflammatorischen Zytokinen erreicht. Die Erhöhung spiegelt sich sowohl in gestiegenen Proteinkonzentrationen im Serum (Abb. 20) als auch in höheren mRNA-Werten in der Milz (Abb. 19) wieder. Das heißt, dass MIF nicht nur die Sekretion von TNF erhöht, sondern auch die de-novo-Proteinsynthese des proinflammatorischen Zytokins in immunparalisierten Mäusen fördert. Die erhöhte Anzahl an proinflammatorischen Zytokinen ermöglicht es, auf eine Infektion mit einer Entzündungsreaktion zu reagieren, was für die Bekämpfung der Krankheitserreger notwendig ist. Die Beobachtung, dass rhMIF die Konzentration und die mRNA-Werte von proinflammatorischen Zytokinen in immunparalisierten Mäusen anhebt, deckt sich mit den Veröffentlichungen über die Eigenschaften von MIF (Roger, 2001). In ihnen wurde gezeigt, dass MIF die Freisetzung von TNF und IL-6 aus Makrophagen induziert (Bernhagen, 1994, Calandra, 1995) und dass MIF-defiziente Makrophagen auf LPS-Stimulus hin deutlich weniger TNF-mRNA bilden als Wildtyp-Zellen (Roger, 2001). Dies kann allerdings nicht der einzige Grund für die schützende Wirkung von rhMIF im Superinfektionsmodell sein, da die Behandlung von immunparalisierten Mäusen mit rhTNF keinen Vorteil bei einer *L.m.* Infektion gebracht hatte (Echtenacher, 2003). Zusätzliche Effekte von MIF, wie die Gegenregulation der immunsuppressiven Glucocorticoide, eine erhöhte Phagozytoserate oder die Inhibition der Apoptose von Makrophagen und Neutrophilen, müssen eine Rolle in diesen Prozess spielen (Baumann, 2003, Calandra, 1995, Mitchell, 2002, Nathan, 1971).

Die Versuche, in denen die immunparalisierten Mäuse vor Superinfektionen geschützt wurden, wurden alle mit 20 µg rhMIF durchgeführt. Deswegen wurde untersucht, ob durch eine Änderung der Dosis gleiche oder sogar bessere Resultate erzielt werden können. Die höchste Dosis, die verwendet wurde, waren 50 µg. Der Grund dafür lag zum einen darin,

dass diese Menge schon eine toxische Wirkung in einer *E.coli*-Peritonitis gezeigt hatte (Calandra, 2000) und zum anderen daran, dass das rekombinante Material limitiert war. Die Behandlung der immunparalisierten Mäuse mit 50 µg rhMIF brachte die gleichen Ergebnisse wie mit einer Dosis von 20 µg. In Abb. 17 sieht man, dass bei einer Dosisreduzierung auf 0,2 µg die schützenden Eigenschaften von MIF nicht mehr vorhanden sind. Dagegen scheint die Menge von 2 µg ausreichend zu sein, um die volle Wirkung in den Tieren zu entfalten. In einem anderen Experiment konnte dies allerdings nicht reproduziert werden, so dass es bei der Dosis von 20 µg rhMIF zur Behandlung der Immunparalyse blieb.

Auch der Zeitpunkt des Einsatzes für rhMIF sollte optimiert werden. Da die Applikation von MIF dem Schutz vor einer Manifestation nosokomialer Infektionen dienen sollte und die Behandlung im Zustand der Immunparalyse stattfinden sollte, ergab sich somit nur ein sehr enges Zeitfenster. Es wurden die Zeitpunkte 16, 6, und 1 Stunde vor der Belastung mit Bakterien gewählt und in Bezug auf das Überleben einer Superinfektion miteinander verglichen (Abb. 17). Dabei zeigte sich, dass der Zeitpunkt 16 Stunden der schlechteste war und dass 6 Stunden vor der Infektion der größte Schutz erreicht wurde. Da die Zeitpunkte 1 und 6 Stunden bezüglich des Schutzes vor Superinfektionen sehr dicht beieinander lagen, wurde als zusätzlicher Vergleichsparameter die Erhöhung von Entzündungsmediatoren im Serum in die Versuche miteinbezogen (Abb. 22). Auch hier war der Zeitpunkt 6 Stunden mit einer höheren Konzentration an Entzündungsmediatoren effektiver und somit wurde er für alle weiteren Experimente als Behandlungszeit gewählt.

5.5. Die Auswirkungen der Neutralisation von MIF zu Beginn der Sepsis auf die Entstehung der Immunparalyse

Die Neutralisation von MIF schützt Mäuse vor den Auswirkungen einer letalen CLP (Calandra, 2000). Da die CLP der Auslöser für die Immunparalyse im Tiermodell ist, stellte sich die Frage, ob dieser Schutz auch Einfluss auf die Entwicklung des immunparalytischen Zustands hat. Die Neutralisation von MIF gleichzeitig zur CLP bewirkt eine Verbesserung des immunsuppressiven Zustands 2 Tage nach CLP durch eine Abschwächung der systemischen Entzündungsreaktion.

Die Neutralisation von MIF gleichzeitig zur CLP verhindert die Entstehung der Immunparalyse in Bezug auf Empfindlichkeit gegenüber Infektionen, da alle Mäuse der mit Antikörper gegen MIF behandelten Gruppe die Belastung mit *S.tm.* überlebten, wohingegen 60 % der Kontrollgruppe starben (Abb. 23).

Um die Frage nach dem Mechanismus des Schutzes der Neutralisation von MIF gleichzeitig zur CLP zu klären, wurden die Serumspiegel von proinflammatorischen Zytokinen nach der Behandlung gemessen (Abb. 24). Die Konzentration von TNF und IL-6 wurde vor allem kurz nach der CLP durch die Antikörper gegen MIF deutlich reduziert. Nach 4 Stunden war dieser Effekt wieder aufgehoben. Diese kurzzeitige Reduktion der Serumspiegel von proinflammatorischen Zytokinen genügte jedoch bereits, um einen Überlebensvorteil 2 Tage nach der Operation im Superinfektionsmodell zu erlangen. Durch die Senkung der Konzentration der proinflammatorischen Zytokine gleich zu Beginn der Entzündung kam es zu einer abgemilderten Inflamationsreaktion, da die Initialisierung der Entzündung von proinflammatorischen Zytokinen ausgelöst wird. Die verminderte systemische Entzündung führte wiederum zu einem geringeren kompensatorischen antiinflammatorischen Response-Syndrom (CARS), welches für die Entwicklung der Immunparalyse von Bedeutung ist (Hoflich, 2002). Somit kam es bei den mit Antikörpern gegen MIF behandelten Tieren nicht zur Immunparalyse und ihr Organismus konnte deswegen besser auf Infektionen reagieren.

Die TNF-Produktionskapazität 2 Tage nach CLP wurde durch die Behandlung mit Antikörpern gegen MIF nicht beeinflusst, da die Werte genauso hoch waren wie die der Kontrollgruppe (Abb. 25). Der Grund, warum die TNF-Produktionskapazität durch die Neutralisation von MIF nicht verändert wird, liegt an den Detektionsgrenzen des ELISAs. Die Werte der Tiere liegen 2 Tage nach CLP am unteren Ende des messbaren Bereichs und können deswegen nur sehr ungenau bestimmt werden. Unterschiede können so kaum wahrgenommen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Neutralisation von MIF zum Zeitpunkt der Entstehung einer systemischen Entzündung eine mögliche Therapieform zur Verhinderung des lebensgefährlichen Zustands der Immunparalyse darstellen könnte. Interessanter wird dieses Ergebnis noch durch die Tatsache, dass die Applikation von Antikörpern gegen MIF auch noch 8 Stunden nach letaler CLP geschützt hat (Calandra, 2000), so dass es vielleicht sogar möglich ist, kurz nach der Entstehung einer Sepsis durch Neutralisieren von MIF die Immunparalyse zu verhindern.

5.6. Die Rolle der Glucocorticoide in der Immunparalyse

Da MIF ein Gegenspieler der Glucocorticoide ist (Calandra, 1995) und diese im Zug einer starken Entzündungsreaktion zur antiinflammatorischen Gegenregulation vom Organismus ausgeschüttet werden (Smoak, 2004), war es wichtig, zu untersuchen, inwieweit man durch die Modulation der Glucocorticoidwirkung die Entstehung der Immunparalyse

beeinflussen kann. Zu diesem Zweck wurde Mifepriston (RU 486), ein synthetisches Steroid mit antigestagener Wirkung, eingesetzt, das in hohen Dosen alle Glucocorticoid-Rezeptoren blockiert und somit keine Glucocorticoidwirkung zulässt (Horwitz, 1992).

Die Hemmung der Glucocorticoidwirkung gleichzeitig zur CLP führt zu einer überschießenden systemischen Entzündung, die eine erhöhte Mortalitätsrate zur Folge hat. Die Inhibition der Glucocorticoideffekte zum Zeitpunkt der CLP erhöhte die Empfindlichkeit gegenüber dem Eingriff (Abb. 27). Durch die Unterdrückung der antiinflammatorischen Wirkung der Glucocorticoide kam es zu einer überschießenden Entzündungsreaktion nach CLP, die in einem Schockzustand gipfelte und damit den Tod der Tiere zur Folge hatte. Die gleiche Wirkung von Mifepriston wurde in einem Endotoxinmodell beobachtet, in dem Ratten, die mit Mifepriston vorbehandelt wurden, empfindlicher für LPS waren als die Kontrollgruppe (Hawes, 1992). Die Schlüsselrolle, die die Glucocorticoide in der Regulation einer Entzündung spielen, wird durch die Tatsache deutlich, dass hypophysen- und nebennierenektomisierte Tiere sehr empfindlich für die systemische Applikation von LPS sind und dies durch die Behandlung mit exogenen Glucocorticoiden wieder aufgehoben werden kann (Bertini, 1988, Silverstein, 1991). Die Hyperinflammation, welche nach CLP und der Applikation von Mifepriston hervorgerufen wurde, wurde durch Erhöhung der Konzentration der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-6 deutlich (Abb. 28). Durch die Inhibition der Glucocorticoideffekte kam es zu einem massiven Anstieg der TNF-Serumkonzentration in den ersten 6 Stunden nach der CLP. Dies verdeutlicht die überschießende Entzündungsreaktion, der die Tiere durch die Kombination aus CLP und Mifepriston-Applikation ausgesetzt sind. Gerade in den ersten Stunden nach CLP werden die meisten proinflammatorischen Zytokine ausgeschüttet, um die Entzündungsreaktion in Gang zu bringen (Abb. 11 + 12), so dass eine starke Erhöhung ihrer Konzentration in dieser Zeit fatale Folgen hat. Bei IL-6 war dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt, aber dennoch erkennbar. Die Ergebnisse stimmen mit bereits publizierten Daten eines Endotoxinmodells überein, in denen es 3 Stunden nach Stimulierung mit LPS zu einer signifikanten Erhöhung der IL-6-Plasmakonzentration von mit Mifepriston behandelten Tieren im Gegensatz zur Kontrollgruppe kam (Hawes, 1992).

Die endogenen Corticosteronwerte wurden durch Mifepriston nicht beeinflusst. Dies bedeutet, dass der Organismus nicht versucht, die Hemmung der Glucocorticoidwirkung durch eine erhöhte Sekretion von Corticosteron zu kompensieren. Das gleiche Ergebnis konnte auch im Endotoxinmodell festgestellt werden (Hawes, 1992).

Durch die Neutralisation von MIF gleichzeitig zur CLP konnte die Entwicklung der Immunparalyse abgeschwächt werden (Abb. 23). Dies wurde durch eine Verminderung der Entzündungsreaktion und der damit verbunden geringeren CARS erreicht. Daraus resultierte die Frage, ob es durch eine Verstärkung der Inflammation, wie sie durch die Behandlung mit Mifepriston erreicht wurde, zu einer Verschlechterung der immunsuppressiven Phase kommt. Die Blockade der Glucocorticoidrezeptoren gleichzeitig zur CLP erhöht die Empfindlichkeit gegenüber Sekundärinfektionen (Abb. 29). Dies zeigte sich in der Mortalitätsrate von 100 % in der mit Mifepriston behandelten Mäuse im Gegensatz zu einer Quote von 50 % in der Kontrollgruppe. Dennoch sind diese Ergebnisse nicht eindeutig, da nur wenige Mäuse die Blockade der Glucocorticoidrezeptoren gleichzeitig zur CLP überlebten und somit nur eine geringe Anzahl an Mäusen für die Superinfektionsexperimente zur Verfügung stand. Die negative Wirkung von Mifepriston auf das Überleben von Sekundärinfektionen spiegelt sich jedoch nicht in der Produktionsbereitschaft von proinflammatorischen Zytokinen 2 Tage nach CLP wieder (Abb. 30). Hierbei zeigte sich erstaunlicherweise eine leichte Erhöhung der Spiegel von TNF und IL-6. Allerdings waren die Werte am Detektionslimit des Tests, so dass es schwierig war, Unterschiede festzustellen. Zusammenfassend kann man sagen, dass es schwer ist, einen Unterschied in der Verschlimmerung eines immunsuppressiven Zustands auszumachen, wenn dies überhaupt möglich ist.

Immunparalytische Mäuse konnten durch die Applikation von rhMIF vor den Folgen einer Superinfektion geschützt werden (Abb. 16). Daher stellte sich die Frage, ob durch Inhibition des Gegenspielers von MIF, den Glucocorticoiden, die gleiche Wirkung erzielt werden kann. Die Blockade der Glucocorticoidrezeptoren in der Immunparalyse führte zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Sekundärinfektionen. Im Tiermodell starben die mit Mifepriston in der Immunparalyse behandelten Mäuse nach einer Infektion mit *S.tm*. schneller als die Kontrollgruppe (Abb. 30). Dieses Ergebnis ist verwunderlich, da die Behandlung mit rhMIF die Serumspiegel von proinflammatorischen Zytokinen erhöhte und somit eine Verbesserung des immunparalytischen Zustands zur Folge hatte (Abb. 19). Deswegen sollte die Inhibition des antiinflammatorischen Gegenspielers die gleichen Effekte induzieren. Doch die Glucocorticoide haben neben ihrer antiinflammatorischen Wirkung, die sie unter anderem durch die Erhöhung der Syntheseraten der antiinflammatorischen Faktoren Lipocortin-1, Serum-Leukoproteaseinhibitor, Clara Zellprotein 10 (CC10), IL-10 und IL-1-Rezeptorantagonisten (Barnes, 1998, Kassel, 2001) erreichen, noch zahlreiche andere Funktionen im Organismus. So sind Glucocorticoide

und ihre Rezeptoren essentiell für das Überleben (Cole, 1995). Sie haben wichtige Funktionen und weit reichende Effekte auf Knochen und Muskeln, auf den Mineral- und Wasserhaushalt und damit den Kreislauf, auf den Stoffwechsel, das Immunsystem und das zentrale Nervensystem. Wegen dieser mannigfaltigen Funktionen und Aufgaben der Glucocorticoide im Körper ist der Ausgang einer Rezeptorblockade während einer Extremsituation wie der Immunparalyse schwer vorherzusagen. Offensichtlich werden in immunparalytischen Mäusen durch die Applikation von Mifepriston wichtige Effektorfunktionen gestört, die die Tiere zum Überleben benötigen. Aus diesem Grund ist eine vollständige Inhibition der Glucocorticoidwirkung während der Immunparalyse schädlich.

5.7. Die Rolle der MIF-Spiegel während des Krankheitsverlaufs der humanen Sepsis

In dieser Arbeit wurde aus einem Patientenkollektiv, in dem alle an einer schweren Sepsis litten, die MIF-Konzentrationen an den Tagen 1, 4 und 11 nach deren Einlieferung auf die Intensivstation, festgestellt. Aus den gesamten Daten wurde der Median der MIF-Werte für den jeweiligen Zeitpunkt bestimmt (Abb. 32). Daraus wurde ersichtlich, dass sich der Median der MIF-Konzentrationen während des zeitlichen Verlaufs nicht änderte. Allerdings muss bei diesen Daten berücksichtigt werden, dass nicht von jedem Patienten bei jedem Abnahmezeitpunkt eine Probe vorlag und dass bei den zwei letzten Zeitpunkten nicht mehr alle Patienten am Leben waren und somit ihre MIF-Spiegel auch nicht mit in die Statistik eingingen.

Um zu überprüfen, ob erhöhte MIF-Plasmaspiegel bei Patienten mit schwerer Sepsis genauso wie beim septischem Schock (Beishuizen, 2001) mit einer erhöhten Mortalitätsrate korrelieren, wurden die Patienten in Gruppen von hohen und niedrigen Konzentrationen an MIF unterteilt und auf den Faktor Überleben untersucht (Abb. 33). Der Schwellenwert für die Aufteilung des Patientenkollektivs zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde durch die AUROC-Methode berechnet. Aufgrund dieser Unterscheidung konnte festgestellt werden, dass nur zum ersten Abnahmezeitpunkt eine Korrelation zwischen hoher Konzentration von MIF und Mortalität besteht. Bei den Patienten mit hohen MIF-Plasmaspiegeln am Tag 1 war das Risiko, an Sepsis zu versterben, fast fünfmal höher als bei der Gruppe, die weniger als 11,875 ng/ml MIF im Plasma hatte. 4 Tage nach der Einlieferung auf die Intensivstation war der Zusammenhang nur noch schwach ausgeprägt, aber nicht mehr signifikant, und am Tag

11 überhaupt nicht mehr vorhanden. Dies hing vor allem mit dem Ableben einiger Patienten zusammen, deren Spiegel dadurch nur zum ersten Messzeitpunkt erfasst wurden. Aber gerade die Personen, die an der Sepsis verstarben, hatten eine hohe MIF-Konzentration, so dass sich die Kurven im Zeitverlauf zwangsläufig annähern. Das bedeutet, dass nur zu Beginn einer schweren Sepsis hohe MIF-Plasmaspiegel ein Indikator für erhöhte Mortalität sind. Diese Tatsache verdeutlicht noch einmal die Erfolgsmöglichkeit einer früh einsetzenden Therapie der Krankheit durch Inhibition von MIF, wie es die Datenlage im Tiermodell bereits gezeigt hat (Abb. 23).

6. Zusammenfassung

Bei der Therapie der Sepsis durch Modulation des Immunsystems ist es von entscheidender Bedeutung, den genauen Immunstatus des Patienten zu kennen. Dies konnte auch im Tiermodell der Sepsis durch die Regulation des proinflammatorischen Proteins MIF nachgewiesen werden. So schützt die Neutralisation von MIF vor der Manifestation der Krankheit vor den Folgen eines septischen Schocks und verringert gleichzeitig die Empfindlichkeit für Sekundärinfektionen in der immunsuppressiven Phase, die nach der systemischen Entzündung einsetzt. Dieser Schutz wurde durch eine Senkung der Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen erreicht, was zu einer abgeschwächten Entzündungsreaktion führte und damit auch eine niedrigere kompensatorische antiinflammatorische Gegenantwort, die für die Entstehung der immunsuppressiven Phase verantwortlich ist, zur Folge hatte.

Die Neutralisation von MIF während eines immundefizienten Zustands führt dagegen zu einer erhöhten Mortalitätsrate bei Sekundärinfektionen. In diesem Zustand schützte die Applikation von exogenem MIF vor den Folgen einer Superinfektion. MIF und die Bereitschaft, TNF auf Stimulus hin zu produzieren, sind in der immunsuppressiven Phase der Sepsis kaum vorhanden. Da aber gerade proinflammatorische Zytokine für die Abwehr von Erregern eine entscheidende Rolle spielen, sind die Tiere in einem immundefizienten Zustand empfindlich für Infektionen. Durch die Gabe von exogenem MIF wurde die Bereitschaft, TNF zu produzieren, teilweise wieder hergestellt und somit die Abwehr gegenüber Erregern verbessert.

Die Modulation des Immunsystems durch die Blockade der Glucocorticoidrezeptoren erwies sich als schwierig. Zwar erhöhte sich, wie erwartet, durch die Hemmung der Glucocorticoidwirkung die Mortalitätsrate der Tiere zu Beginn einer Sepsis infolge einer überschießenden systemischen Entzündungsreaktion. Dennoch wurde auf Grund der Blockade der endogenen antiinflammatorischen Wirkung der Glucocorticoide kein Überlebensvorteil von immunsupprimierten Tiere im Superinfektionsmodell erreicht, sondern im Gegenteil, eine erhöhte Empfindlichkeit wurde festgestellt. Die schwere Prognostizierbarkeit der Auswirkungen einer Blockade der Glucocorticoidrezeptoren im Tiermodell lässt sich mit den mannigfaltigen Aufgaben der Glucocorticoide im Organismus erklären.

In einer humanen Sepsisstudie wurde die Bedeutung von MIF als prognostischer Faktor deutlich. So korrelieren hohe MIF-Plasmakonzentrationen zu Beginn der Erkrankung mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko.

7. Literaturverzeichnis

- Astal, Z.** (2004) Susceptibility patterns in *Pseudomonas aeruginosa* causing nosocomial infections. *J.Chemother.* **16**, 264-268.
- Bacher, M., Meinhardt, A., Lan, H. Y., Dhabhar, F. S., Mu, W., Metz, C. N., Chesney, J. A., Gerns, D., Donnelly, T., Atkins, R. C., Bucala, R.** (1998) MIF expression in the rat brain: implications for neuronal function. *Mol.Med.* **4**, 217-230.
- Bacher, M., Meinhardt, A., Lan, H. Y., Mu, W., Metz, C. N., Chesney, J. A., Calandra, T., Gerns, D., Donnelly, T., Atkins, R. C., Bucala, R.** (1997) Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am.J.Pathol.* **150**, 235-246.
- Bacher, M., Metz, C. N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gerns, D., Donnelly, T., Bucala, R.** (1996) An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 7849-7854.
- Barnes, P. J.** (1998) Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin.Sci.(Lond)* **94**, 557-572.
- Baugh, J. A., Bucala, R.** (2002) Macrophage migration inhibitory factor. *Crit Care Med.* **30**, S27-S35.
- Baumann, R., Casaulta, C., Simon, D., Conus, S., Yousefi, S., Simon, H. U.** (2003) Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *FASEB J.* **17**, 2221-2230.
- Beishuizen, A., Thijs, L. G., Haanen, C., Vermes, I.** (2001) Macrophage migration inhibitory factor and hypothalamo-pituitary-adrenal function during critical illness. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **86**, 2811-2816.
- Bernard, G. R., Vincent, J. L., Laterre, P. F., LaRosa, S. P., Dhainaut, J. F., Lopez-Rodriguez, A., Steingrub, J. S., Garber, G. E., Helterbrand, J. D., Ely, E. W., Fisher, C. J., Jr.** (2001) Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N.Engl.J.Med.* **344**, 699-709.
- Bernhagen, J., Calandra, T., Bucala, R.** (1998) Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features. *J.Mol.Med.* **76**, 151-161.
- Bernhagen, J., Calandra, T., Mitchell, R. A., Martin, S. B., Tracey, K. J., Voelter, W., Manogue, K. R., Cerami, A., Bucala, R.** (1993) MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* **365**, 756-759.
- Bernhagen, J., Mitchell, R. A., Calandra, T., Voelter, W., Cerami, A., Bucala, R.** (1994) Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemistry* **33**, 14144-14155.

- Bertini, R., Bianchi, M., Ghezzi, P.** (1988) Adrenalectomy sensitizes mice to the lethal effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J.Exp.Med.* **167**, 1708-1712.
- Bloom, B. R., Bennett, B.** (1966) Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* **153**, 80-82.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA.** (1992) American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* **20**, 864-874.
- Bone, R. C., Fisher, C. J., Jr., Clemmer, T. P., Slotman, G. J., Metz, C. A., Balk, R. A.** (1989) Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med.* **17**, 389-393.
- Bozza, F. A., Gomes, R. N., Japiassu, A. M., Soares, M., Castro-Faria-Neto, H. C., Bozza, P. T., Bozza, M. T.** (2004) Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock* **22**, 309-313.
- Bozza, M., Kolakowski, L. F., Jr., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., David, J. R., Gerard, C.** (1995) Structural characterization and chromosomal location of the mouse macrophage migration inhibitory factor gene and pseudogenes. *Genomics* **27**, 412-419.
- Bozza, M., Satoskar, A. R., Lin, G., Lu, B., Humbles, A. A., Gerard, C., David, J. R.** (1999) Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J.Exp.Med.* **189**, 341-346.
- Bruunsgaard, H., Pedersen, M., Pedersen, B. K.** (2001) Aging and proinflammatory cytokines. *Curr.Opin.Hematol.* **8**, 131-136.
- Burger-Kentischer, A., Goebel, H., Seiler, R., Fraedrich, G., Schaefer, H. E., Dimmeler, S., Kleemann, R., Bernhagen, J., Ihling, C.** (2002) Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis. *Circulation* **105**, 1561-1566.
- Calandra, T., Bernhagen, J., Metz, C. N., Spiegel, L. A., Bacher, M., Donnelly, T., Cerami, A., Bucala, R.** (1995) MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* **377**, 68-71.
- Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R. A., Bucala, R.** (1994) The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J.Exp.Med.* **179**, 1895-1902.
- Calandra, T., Echtenacher, B., Roy, D. L., Pugin, J., Metz, C. N., Hultner, L., Heumann, D., Mannel, D., Bucala, R., Glauser, M. P.** (2000) Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat.Med.* **6**, 164-170.
- Calandra, T., Roger, T.** (2003) Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat.Rev.Immunol.* **3**, 791-800.
- Calandra, T., Spiegel, L. A., Metz, C. N., Bucala, R.** (1998) Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 11383-11388.

- Chesney, J., Metz, C., Bacher, M., Peng, T., Meinhardt, A., Bucala, R.** (1999) An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol.Med.* **5**, 181-191.
- Chook, Y. M., Gray, J. V., Ke, H., Lipscomb, W. N.** (1994) The monofunctional chorismate mutase from *Bacillus subtilis*. Structure determination of chorismate mutase and its complexes with a transition state analog and prephenate, and implications for the mechanism of the enzymatic reaction. *J.Mol.Biol.* **240**, 476-500.
- Cole, T. J., Blendy, J. A., Monaghan, A. P., Krieglstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., Fantuzzi, G., Hummler, E., Unsicker, K., Schutz, G.** (1995) Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* **9**, 1608-1621.
- Cresswell, P.** (1994) Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu.Rev.Immunol.* **12**, 259-293.
- David, J. R.** (1993) Erratum: Important note on recombinant macrophage migration inhibition factor. *J.Immunol.* **151**
- David, J. R.** (1966) Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **56**, 72-77.
- de Jong, Y. P., Abadia-Molina, A. C., Satoskar, A. R., Clarke, K., Rietdijk, S. T., Faubion, W. A., Mizoguchi, E., Metz, C. N., Alsahli, M., ten Hove, T., Keates, A. C., Lubetsky, J. B., Farrell, R. J., Michetti, P., van Deventer, S. J., Lolis, E., David, J. R., Bhan, A. K., Terhorst, C.** (2001) Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat.Immunol.* **2**, 1061-1066.
- del Vecchio, M. T., Tripodi, S. A., Arcuri, F., Pergola, L., Hako, L., Vatti, R., Cintonino, M.** (2000) Macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma: correlation with tumor grading and combination endocrine treatment-related changes. *Prostate* **45**, 51-57.
- Dellinger, R. P., Carlet, J. M., Masur, H., Gerlach, H., Calandra, T., Cohen, J., Gea-Banacloche, J., Keh, D., Marshall, J. C., Parker, M. M., Ramsay, G., Zimmerman, J. L., Vincent, J. L., Levy, M. M.** (2004) Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* **32**, 858-873.
- Dios, A., Mitchell, R. A., Aljabari, B., Lubetsky, J., O'Connor, K., Liao, H., Senter, P. D., Manogue, K. R., Lolis, E., Metz, C., Bucala, R., Callaway, D. J., Al Abed, Y.** (2002) Inhibition of MIF bioactivity by rational design of pharmacological inhibitors of MIF tautomerase activity. *J.Med.Chem.* **45**, 2410-2416.
- Donnelly, S. C., Haslett, C., Reid, P. T., Grant, I. S., Wallace, W. A., Metz, C. N., Bruce, L. J., Bucala, R.** (1997) Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat.Med.* **3**, 320-323.
- Echtenacher, B., Falk, W., Mannel, D. N., Krammer, P. H.** (1990) Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *J.Immunol.* **145**, 3762-3766.

- Echtenacher, B., Freudenberg, M. A., Jack, R. S., Mannel, D. N.** (2001) Differences in innate defense mechanisms in endotoxemia and polymicrobial septic peritonitis. *Infect.Immun.* **69**, 7271-7276.
- Echtenacher, B., Urbaschek, R., Weigl, K., Freudenberg, M. A., Mannel, D. N.** (2003) Treatment of experimental sepsis-induced immunoparalysis with TNF. *Immunobiology* **208**, 381-389.
- Foote, A., Briganti, E. M., Kipen, Y., Santos, L., Leech, M., Morand, E. F.** (2004) Macrophage migration inhibitory factor in systemic lupus erythematosus. *J.Rheumatol.* **31**, 268-273.
- Gando, S., Nishihira, J., Kobayashi, S., Morimoto, Y., Nanzaki, S., Kemmotsu, O.** (2001) Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med.* **27**, 1187-1193.
- GEORGE, M., VAUGHAN, J. H.** (1962) In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **111**, 514-521.
- Hawes, A. S., Rock, C. S., Keogh, C. V., Lowry, S. F., Calvano, S. E.** (1992) In vivo effects of the antiglyucocorticoid RU 486 on glucocorticoid and cytokine responses to Escherichia coli endotoxin. *Infect.Immun.* **60**, 2641-2647.
- Hoflich, C., Volk, H. D.** (2002) [Immunomodulation in sepsis]. *Chirurg* **73**, 1100-1104.
- Horwitz, K. B.** (1992) The molecular biology of RU486. Is there a role for antiprogestins in the treatment of breast cancer? *Endocr.Rev.* **13**, 146-163.
- Juttner, S., Bernhagen, J., Metz, C. N., Rollinghoff, M., Bucala, R., Gessner, A.** (1998) Migration inhibitory factor induces killing of Leishmania major by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha. *J.Immunol.* **161**, 2383-2390.
- Kariya, S., Okano, M., Aoji, K., Kosaka, M., Chikumoto, E., Hattori, H., Yuen, K., Nishioka, S., Nishioka, K., Nishizaki, K.** (2003) Role of macrophage migration inhibitory factor in otitis media with effusion in adults. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **10**, 417-422.
- Kassel, O., Sancono, A., Kratzschmar, J., Kreft, B., Stassen, M., Cato, A. C.** (2001) Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *EMBO J.* **20**, 7108-7116.
- Kato, Y., Muto, T., Tomura, T., Tsumura, H., Watarai, H., Mikayama, T., Ishizaka, K., Kuroki, R.** (1996) The crystal structure of human glycosylation-inhibiting factor is a trimeric barrel with three 6-stranded beta-sheets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 3007-3010.
- Keh, D., Sprung, C. L.** (2004) Use of corticosteroid therapy in patients with sepsis and septic shock: an evidence-based review. *Crit Care Med.* **32**, S527-S533.
- Kettelhut, I. C., Fiers, W., Goldberg, A. L.** (1987) The toxic effects of tumor necrosis factor in vivo and their prevention by cyclooxygenase inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 4273-4277.

- Kitaichi, N., Kotake, S., Mizue, Y., Matsuda, H., Onoe, K., Nishihira, J.** (2000) Increase of macrophage migration inhibitory factor in sera of patients with iridocyclitis. *Br.J.Ophthalmol.* **84**, 1423-1425.
- Kitaichi, N., Kotake, S., Sasamoto, Y., Namba, K., Matsuda, A., Ogasawara, K., Onoe, K., Matsuda, H., Nishihira, J.** (1999) Prominent increase of macrophage migration inhibitory factor in the sera of patients with uveitis. *Invest Ophthalmol. Vis.Sci.* **40**, 247-250.
- Kleemann, R., Hausser, A., Geiger, G., Mischke, R., Burger-Kentischer, A., Flieger, O., Johannes, F. J., Roger, T., Calandra, T., Kapurniotu, A., Grell, M., Finkelmeier, D., Brunner, H., Bernhagen, J.** (2000) Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature* **408**, 211-216.
- Kleemann, R., Kapurniotu, A., Frank, R. W., Gessner, A., Mischke, R., Flieger, O., Juttner, S., Brunner, H., Bernhagen, J.** (1998) Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase. *J.Mol.Biol.* **280**, 85-102.
- Knaus, W. A., Draper, E. A., Wagner, D. P., Zimmerman, J. E.** (1985) APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med.* **13**, 818-829.
- Koebernick, H., Grode, L., David, J. R., Rohde, W., Rolph, M. S., Mittrucker, H. W., Kaufmann, S. H.** (2002) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a pivotal role in immunity against Salmonella typhimurium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 13681-13686.
- Kox, W. J., Volk, T., Kox, S. N., Volk, H. D.** (2000) Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med.* **26 Suppl 1**, S124-S128.
- Kozak, C. A., Adamson, M. C., Buckler, C. E., Segovia, L., Paralkar, V., Wistow, G.** (1995) Genomic cloning of mouse MIF (macrophage inhibitory factor) and genetic mapping of the human and mouse expressed gene and nine mouse pseudogenes. *Genomics* **27**, 405-411.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lan, H. Y., Yang, N., Nikolic-Paterson, D. J., Yu, X. Q., Mu, W., Isbel, N. M., Metz, C. N., Bucala, R., Atkins, R. C.** (2000) Expression of macrophage migration inhibitory factor in human glomerulonephritis. *Kidney Int.* **57**, 499-509.
- Leech, M., Metz, C., Hall, P., Hutchinson, P., Gianis, K., Smith, M., Weedon, H., Holdsworth, S. R., Bucala, R., Morand, E. F.** (1999) Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum.* **42**, 1601-1608.
- Leech, M., Metz, C., Santos, L., Peng, T., Holdsworth, S. R., Bucala, R., Morand, E. F.** (1998) Involvement of macrophage migration inhibitory factor in the evolution of rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum.* **41**, 910-917.
- Lehmann, L. E., Novender, U., Schroeder, S., Pietsch, T., von Spiegel, T., Putensen, C., Hoeft, A., Stuber, F.** (2001) Plasma levels of macrophage migration inhibitory

- factor are elevated in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* **27**, 1412-1415.
- Leng, L., Metz, C. N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R. A., Bucala, R.** (2003) MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J.Exp.Med.* **197**, 1467-1476.
- Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S., Moss, M.** (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N.Engl.J.Med.* **348**, 1546-1554.
- Marx, G.** (2003) Fluid therapy in sepsis with capillary leakage. *Eur.J.Anaesthesiol.* **20**, 429-442.
- Matsumoto, K., Kanmatsuse, K.** (2001) Increased production of macrophage migration inhibitory factor by T cells in patients with IgA nephropathy. *Am.J.Nephrol.* **21**, 455-464.
- Matsunaga, J., Sinha, D., Pannell, L., Santis, C., Solano, F., Wistow, G. J., Hearing, V. J.** (1999a) Enzyme activity of macrophage migration inhibitory factor toward oxidized catecholamines. *J.Biol.Chem.* **274**, 3268-3271.
- Matsunaga, J., Sinha, D., Solano, F., Santis, C., Wistow, G., Hearing, V.** (1999b) Macrophage migration inhibitory factor (MIF)--its role in catecholamine metabolism. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)* **45**, 1035-1040.
- McInnes, A., Rennick, D. M.** (1988) Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. *J.Exp.Med.* **167**, 598-611.
- Metz, C. N., Bucala, R.** (1997) Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulation of the immune response. *Adv.Immunol.* **66**, 197-223.
- Mikulowska, A., Metz, C. N., Bucala, R., Holmdahl, R.** (1997) Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice. *J.Immunol.* **158**, 5514-5517.
- Mischke, R.** (2000) Makrophagen migrationsinhibierender Faktor (MIF): Struktur- und Aktivitätsstudien. *Elektronische Hochschulschriften der Universität Stuttgart*.
- Mitchell, R., Bacher, M., Bernhagen, J., Pushkarskaya, T., Seldin, M. F., Bucala, R.** (1995) Cloning and characterization of the gene for mouse macrophage migration inhibitory factor (MIF). *J.Immunol.* **154**, 3863-3870.
- Mitchell, R. A., Liao, H., Chesney, J., Fingerle-Rowson, G., Baugh, J., David, J., Bucala, R.** (2002) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 345-350.
- Mitchell, R. A., Metz, C. N., Peng, T., Bucala, R.** (1999) Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J.Biol.Chem.* **274**, 18100-18106.
- Muhlhahn, P., Bernhagen, J., Czisch, M., Georgescu, J., Renner, C., Ross, A., Bucala, R., Holak, T. A.** (1996) NMR characterization of structure, backbone

- dynamics, and glutathione binding of the human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Protein Sci.* **5**, 2095-2103.
- Murakami, H., Akbar, S. M., Matsui, H., Onji, M.** (2001) Macrophage migration inhibitory factor in the sera and at the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis: clinical implications and pathogenic significance. *Eur.J.Clin.Invest* **31**, 337-343.
- Nathan, C. F., Karnovsky, M. L., David, J. R.** (1971) Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. *J.Exp.Med.* **133**, 1356-1376.
- Nathan, C. F., Remold, H. G., David, J. R.** (1973) Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage functions. *J.Exp.Med.* **137**, 275-290.
- Niino, M., Ogata, A., Kikuchi, S., Tashiro, K., Nishihira, J.** (2000) Macrophage migration inhibitory factor in the cerebrospinal fluid of patients with conventional and optic-spinal forms of multiple sclerosis and neuro-Behcet's disease. *J.Neurol.Sci.* **179**, 127-131.
- Nishino, T., Bernhagen, J., Shiiki, H., Calandra, T., Dohi, K., Bucala, R.** (1995) Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol.Med.* **1**, 781-788.
- Ogawa, H., Nishihira, J., Sato, Y., Kondo, M., Takahashi, N., Oshima, T., Todo, S.** (2000) An antibody for macrophage migration inhibitory factor suppresses tumour growth and inhibits tumour-associated angiogenesis. *Cytokine* **12**, 309-314.
- Onodera, S., Kaneda, K., Mizue, Y., Koyama, Y., Fujinaga, M., Nishihira, J.** (2000) Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *J.Biol.Chem.* **275**, 444-450.
- Paralkar, V., Wistow, G.** (1994) Cloning the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Genomics* **19**, 48-51.
- Petrovsky, N., Socha, L., Silva, D., Grossman, A. B., Metz, C., Bucala, R.** (2003) Macrophage migration inhibitory factor exhibits a pronounced circadian rhythm relevant to its role as a glucocorticoid counter-regulator. *Immunol.Cell Biol.* **81**, 137-143.
- Philo, J. S., Yang, T. H., LaBarre, M.** (2004) Re-examining the oligomerization state of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in solution. *Biophys.Chem.* **108**, 77-87.
- Quadrilatero, J., Guan, J., Boudreau, J., Marra, S., Hoffman-Goetz, L.** (2005) Polyethylene glycol but not mifepristone prevents intestinal lymphocyte loss following treadmill exercise in mice. *Acta Physiol Scand.* **183**, 201-209.
- Rich A.R. und Lewis M.R.** (1932). Migration of neutrophils and macrophages. *Bull. John Hopkins Hosp.* **81**, 115-131.
- Roger, T., David, J., Glauser, M. P., Calandra, T.** (2001) MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* **414**, 920-924.

- Rosengren, E., Aman, P., Thelin, S., Hansson, C., Ahlfors, S., Bjork, P., Jacobsson, L., Rorsman, H.** (1997) The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase. *FEBS Lett.* **417**, 85-88.
- Rosengren, E., Bucala, R., Aman, P., Jacobsson, L., Odh, G., Metz, C. N., Rorsman, H.** (1996) The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol.Med.* **2**, 143-149.
- Rossi, A. G., Haslett, C., Hirani, N., Greening, A. P., Rahman, I., Metz, C. N., Bucala, R., Donnelly, S. C.** (1998) Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma. *J.Clin.Invest* **101**, 2869-2874.
- Sakai, Y., Masamune, A., Satoh, A., Nishihira, J., Yamagiwa, T., Shimosegawa, T.** (2003) Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* **124**, 725-736.
- Sant, A. J., Cullen, S. E., Schwartz, B. D.** (1985) Biosynthetic relationships of the chondroitin sulfate proteoglycan with Ia and invariant chain glycoproteins. *J.Immunol.* **135**, 416-422.
- Santos, L., Hall, P., Metz, C., Bucala, R., Morand, E. F.** (2001) Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids. *Clin.Exp.Immunol.* **123**, 309-314.
- Selvi, E., Tripodi, S. A., Catenaccio, M., Lorenzini, S., Chindamo, D., Manganelli, S., Romagnoli, R., Ietta, F., Paulesu, L., Miracco, C., Cintorino, M., Marcolongo, R.** (2003) Expression of macrophage migration inhibitory factor in diffuse systemic sclerosis. *Ann.Rheum.Dis.* **62**, 460-464.
- Sessler, C. N., Perry, J. C., Varney, K. L.** (2004) Management of severe sepsis and septic shock. *Curr.Opin.Crit Care* **10**, 354-363.
- Shimizu, K., Amagaya, S., Ogihara, Y.** (1983) Analysis of corticosterone in the serum of mice and rats using high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.* **272**, 170-175.
- Shimizu, T., Abe, R., Nakamura, H., Ohkawara, A., Suzuki, M., Nishihira, J.** (1999) High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **264**, 751-758.
- Shimizu, T., Abe, R., Ohkawara, A., Mizue, Y., Nishihira, J.** (1997) Macrophage migration inhibitory factor is an essential immunoregulatory cytokine in atopic dermatitis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **240**, 173-178.
- Silverstein, R., Turley, B. R., Christoffersen, C. A., Johnson, D. C., Morrison, D. C.** (1991) Hydrazine sulfate protects D-galactosamine-sensitized mice against endotoxin and tumor necrosis factor/cachectin lethality: evidence of a role for the pituitary. *J.Exp.Med.* **173**, 357-365.
- Smoak, K. A., Cidlowski, J. A.** (2004) Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech.Ageing Dev.* **125**, 697-706.

- Soulet, D., Rivest, S.** (2003) Polyamines play a critical role in the control of the innate immune response in the mouse central nervous system. *J.Cell Biol.* **162**, 257-268.
- Steinhoff, M., Meinhardt, A., Steinhoff, A., Gemsa, D., Bucala, R., Bacher, M.** (1999) Evidence for a role of macrophage migration inhibitory factor in psoriatic skin disease. *Br.J.Dermatol.* **141**, 1061-1066.
- Subramanya, H. S., Roper, D. I., Dauter, Z., Dodson, E. J., Davies, G. J., Wilson, K. S., Wigley, D. B.** (1996) Enzymatic ketonization of 2-hydroxymuconate: specificity and mechanism investigated by the crystal structures of two isomerases. *Biochemistry* **35**, 792-802.
- Sugimoto, H., Suzuki, M., Nakagawa, A., Tanaka, I., Nishihira, J.** (1996) Crystal structure of macrophage migration inhibitory factor from human lymphocyte at 2.1 Å resolution. *FEBS Lett.* **389**, 145-148.
- Sugimoto, H., Taniguchi, M., Nakagawa, A., Tanaka, I., Suzuki, M., Nishihira, J.** (1997) Crystallization and preliminary X-ray analysis of human D-dopachrome tautomerase. *J.Struct.Biol.* **120**, 105-108.
- Sun, H. W., Bernhagen, J., Bucala, R., Lolis, E.** (1996) Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 5191-5196.
- Suzuki, H., Kanagawa, H., Nishihira, J.** (1996a) Evidence for the presence of macrophage migration inhibitory factor in murine reproductive organs and early embryos. *Immunol.Lett.* **51**, 141-147.
- Suzuki, M., Sugimoto, H., Nakagawa, A., Tanaka, I., Nishihira, J., Sakai, M.** (1996b) Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver. *Nat.Struct.Biol.* **3**, 259-266.
- Swope, M., Sun, H. W., Blake, P. R., Lolis, E.** (1998) Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor. *EMBO J.* **17**, 3534-3541.
- Takahashi, N., Nishihira, J., Sato, Y., Kondo, M., Ogawa, H., Ohshima, T., Une, Y., Todo, S.** (1998) Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol.Med.* **4**, 707-714.
- Thiel, M.** (2000) [Inflammation and immunoparalysis. What are the differential criteria?]. *Anaesthesist* **49**, 466-471.
- Thurman, G. B., Braude, I. A., Gray, P. W., Oldham, R. K., Stevenson, H. C.** (1985) MIF-like activity of natural and recombinant human interferon-gamma and their neutralization by monoclonal antibody. *J.Immunol.* **134**, 305-309.
- Torres, M. B., De Maio, A.** (2005) An Exaggerated Inflammatory Response after CLP Correlates with a Negative Outcome. *J.Surg.Res.* **125**, 88-93.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**, 4350-4354.

- Volk, H. D., Thieme, M., Heym, S., Docke, W. D., Ruppe, U., Tausch, W., Manger, D., Zuckermann, S., Golosubow, A., Nieter, B., .** (1991) Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease--predictive value and new therapeutic strategies. *Behring Inst.Mitt.* 208-215.
- Waeber, G., Calandra, T., Roduit, R., Haeffliger, J. A., Bonny, C., Thompson, N., Thorens, B., Temler, E., Meinhardt, A., Bacher, M., Metz, C. N., Nicod, P., Bucala, R.** (1997) Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 4782-4787.
- Waeber, G., Thompson, N., Chautard, T., Steinmann, M., Nicod, P., Pralong, F. P., Calandra, T., Gaillard, R. C.** (1998) Transcriptional activation of the macrophage migration-inhibitory factor gene by the corticotropin-releasing factor is mediated by the cyclic adenosine 3',5'- monophosphate responsive element-binding protein CREB in pituitary cells. *Mol.Endocrinol.* **12**, 698-705.
- Walley, K. R., Lukacs, N. W., Standiford, T. J., Strieter, R. M., Kunkel, S. L.** (1996) Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect.Immun.* **64**, 4733-4738.
- Weiser, W. Y., Temple, P. A., Witek-Giannotti, J. S., Remold, H. G., Clark, S. C., David, J. R.** (1989) Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 7522-7526.
- Wright, C. J., van Endert, P., Moller, P., Lipp, J., Ling, N. R., MacLennan, I. C., Koch, N., Moldenhauer, G.** (1990) Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface. *J.Biol.Chem.* **265**, 5787-5792.
- Xu, D., McSorley, S. J., Tetley, L., Chatfield, S., Dougan, G., Chan, W. L., Satoskar, A., David, J. R., Liew, F. Y.** (1998) Protective effect on Leishmania major infection of migration inhibitory factor, TNF-alpha, and IFN-gamma administered orally via attenuated Salmonella typhimurium. *J.Immunol.* **160**, 1285-1289.
- Yabunaka, N., Nishihira, J., Mizue, Y., Tsuji, M., Kumagai, M., Ohtsuka, Y., Imamura, M., Asaka, M.** (2000) Elevated serum content of macrophage migration inhibitory factor in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **23**, 256-258.
- Yamada, G., Shijubo, N., Takagi-Takahashi, Y., Nishihira, J., Mizue, Y., Kikuchi, K., Abe, S.** (2002) Elevated levels of serum macrophage migration inhibitory factor in patients with pulmonary tuberculosis. *Clin.Immunol.* **104**, 123-127.
- Yang, Y., Degranpre, P., Kharfi, A., Akoum, A.** (2000) Identification of macrophage migration inhibitory factor as a potent endothelial cell growth-promoting agent released by ectopic human endometrial cells. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **85**, 4721-4727.
- Zeng, F. Y., Weiser, W. Y., Kratzin, H., Stahl, B., Karas, M., Gabius, H. J.** (1993) The major binding protein of the interferon antagonist sarcolectin in human placenta is a macrophage migration inhibitory factor. *Arch.Biochem.Biophys.* **303**, 74-80.
- Zhang, M., Aman, P., Grubb, A., Panagopoulos, I., Hindemith, A., Rosengren, E., Rorsman, H.** (1995) Cloning and sequencing of a cDNA encoding rat D-dopachrome tautomerase. *FEBS Lett.* **373**, 203-206.

8. Abkürzungen

ABTS	2'2-Azino-di(3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure(6))
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AP	Alkalische Phosphatase
ARDS	acute respiratory distress syndrome
BSA	Bovine Serum Albumin
CARS	compensatory antiinflammatory response-syndrome
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CLP	cecal ligation and puncture
cPLA ₂	cytosolic phospholipase A ₂
CRF	Corticotropin-releasing Factor
DHICA	5,6-Dihydroxyindol-2-Carboxysäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTH	Delayed-type hypersensitivity
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum
GIF	Glycosylation Inhibiting Factor
HPA	Hypothalamus, pituitary gland, adrenal gland
huMIF	humanes MIF
IFN- γ	Interferon Gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KBE	koloniebildende Einheiten
kDa	kilo Dalton
LB	Luria-Bertani; Rezeptur nach Lennox
LDH	Lactatdehydrogenase
<i>L.m.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LPS	Lipopolysaccharid
m	murin
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIF	Makrophagen migrationsinhibierender Faktor
MIF ^{-/-}	MIF knock-out Maus

Abkürzungen

MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	messenger RNA
NMRI	Naval Marine Research Institute
NO	Stickoxid
<i>P.a.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PC	Protein C
PEG	Polyethylenglycol
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
POX	Peroxidase
rhAPC	rekombinantes humanes aktiviertes Protein C
rhMIF	rekombinantes humanes MIF
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roosevelt Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIRS	systemical inflammatory response-syndrome
SPEA	Streptococcal pyrogenic exotoxin A
<i>S.tm.</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
TNF	Tumor necrosis factor
TNF ^{-/-}	TNF knock-out Maus
TSH	Thyrotropin
TSST-1	Toxic shock syndrome toxine-1
Tween	Polyoxyethylensorbitmonolaurat
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

9. Publikationen

N. Pollak, T. Sterns, B. Echtenacher, und D. N. Männel. Improved resistance to bacterial superinfection in mice by treatment with macrophage migration inhibitory factor. *Infection and Immunity*. Manuskript im Druck.

Nils Pollak, Daniela N. Männel, Rainer H. Straub, Franz Audebert, Peter J. Wild. Plasma levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in patients with severe sepsis. *Shock*. Manuskript eingereicht.

Theo Sterns, Nils Pollak, Bernd Echtenacher, und Daniela N. Männel. Divergence of sepsis-induced immune suppression and LPS tolerance. *Infection and Immunity*. Manuskript im Druck.

10. Danksagung

Bei allen, die mir beim Anfertigen dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen, möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken:

Bei Frau Prof. Dr. Daniela Männel für die Überlassung eines wirklich hoch interessanten Themas. Darüber hinaus für die kontinuierliche Unterstützung, das entgegengebrachte Vertrauen und die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Die stete Diskussionsbereitschaft und die konstruktiven Lösungsvorschläge haben zum großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Armin Buschauer möchte ich für die Bereitschaft die fakultätsinterne Vertretung dieser Dissertation zu übernehmen danken, was mir diese Promotion erst ermöglichte.

Herrn Dr. Bernd Echtenacher möchte ich für die praktische und theoretische Betreuung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Thierry Calandra und der Firma Novartis aus Wien danke ich für das großzügige Überlassen von rekombinatem MIF.

Mein herzlicher Dank geht auch an alle momentanen und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe Männel. Es hat viel Spaß gemacht in dieser Atmosphäre zu arbeiten. An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank den Mitgliedern des „Gingerino-Clubs“.

Meiner Verlobten danke ich für die moralische und seelische Unterstützung in schlechten Zeiten und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zu guter letzt möchte ich meinen Eltern danken, die mich während der ganzen Zeit des Studiums und der Promotion in jeglicher Art unterstützt haben.

Hiermit versichere ich dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

.....

Nils Pollak